平成２５年　１月　７日

日本弁理士会
会長　奥　山　尚　一　様

バイオ・ライフサイエンス委員会
委員長　　大　澤　健　一
（第３部会）
副委員長　越　智　　　豊
委　員　　大　平　和　幸
委　員　　黒　崎　文　枝
委　員　　井　上　恵　雄

答申書

平成２４年４月２４日付諮問事項「日本のバイオ・ライフサイエンス産業の国際的競争力の特許面からの調査及び研究」について、当委員会において審議した結果、下記のとおり答申致します。

記

Ⅰ．結　論

日本のバイオ・ライフサイエンス産業の国際的競争力について、iPS細胞及びiPS細胞関連の再生医療については未だ、特許面からは有利性を保っているが、将来的には脆弱と考える。

今後も有利性を保つためには、効率の良い研究投資と、弁理士とともに効率の良い特許化が求められる。

Ⅱ．理　由

１）　iPS細胞そのものについては、権利の範囲に差があるものの日米欧で特許が成立した。ＥＰでの異議申し立ての結論が出ておらず、予断を許さないが、有利性は否定出来ない。しかし、あくまでもiPS細胞作成のクラシカルな作成方法であり、臨床応用時にこの特許がどれだけ利用され

るかは、その直前にならないと分からないのが現実である。

２）　心筋梗塞後の心不或いは拡張型心筋症には、心臓移植しか根本的治療がなかったが、iPS 細胞から心筋細胞を誘導し、心臓にパッチとして移植する方法が有望視されている。現実に、大阪大学では、筋肉幹細胞からのパッチを作成し、移植の症例を増やしている。これらの関連特許を検討するに株式会社セルシードから出願されている心筋様細胞シート〔出願者は岡野教授（東京女子医科大学)、沢教授（大阪大学ら)〕は日本では特許化され、欧米でも減縮はしつつも、特許化手前であり、今のところ、ライバルとなる出願は現時点では見当たらず、有利である。

３）　成人の失明に至る黄斑変性症、網膜色素変性症には、現在、根治的治療法がなく、ＶＥＧＦの眼内注射でかろうじて進行を遅らせるのが精一杯であるが、iPS 細胞から網膜細胞を誘導し、移植する方法が有望視されている。現実に、マウスを使った実験で効果が得られ、臨床治験が最も早い iPS 細胞再生医療として治験の法制化が進められている。この関連特許を検討すると、日本では基本特許は特許化されたが、米国で後発のベンチャーが同様な特許が取得されていることが判明した。米国特許の成立を阻止するため、情報提供を色々と行ったが、結果的には成立してしまい、今後、米国での実用化には支障となるのは必須と思われる。

４）　このように、現在は日本の研究が先行しているが、米国では、再生医療に注目が集まり、iPS細胞を利用した再生医療に莫大な研究費が投じられつつある。一方、日本でも政府関連予算で６００億を投じると言われているが、米国ではカリフォルニア州だけでも年間１千億と言われており、現時点で判明している特許出願は１年半前のものである。今後も有利性を保つためには、効率の良い研究投資と、弁理士とともに効率の良い特許化が求められる。

Ⅲ．各論

目次

１．はじめに

ライフサイエンス委員会当部会では、ここ数年、iPS 細胞についての京都大学山中教授の特許を検討してきた。細胞の初期化が、マウスのみならずヒトでも同じたった４つの遺伝子で行えることを証明したのは画期的であり、いつかはノーベル賞を受賞するのは確実視されていたが、今年あっさりと受賞してしまうとは本人も予測していなかったと思える。背景には、この iPS 細胞から分化させることの出来る色々な細胞を利用して再生医療への期待が高まり、現実、これらを研究する大学、ベンチャーが激増していることもあると思われる。それだけの画期的な発明、発見であったことは間違いない

今回、iPS 細胞の今までの特許を振り返りながら、日本で審判を経て認められた特許、ＥＰでの異議申し立てを検討し、更には、再生医療の中でも臨床応用が近いとされている心筋再生、網膜再生についての関連特許も検討を行い、日本のバイオ・ライフサイエンス産業の国際的競争力について検討した。

２．iPS 細胞特許の現状分析（担当　大平　和幸）

２－１

）　本年１０月に山中伸也京都大学 iPS 細胞研究所長がノーベル医学生理学賞が受賞した。２００７年のヒトでの成功からわずか５年でのノーベル賞受賞となった。そのパイオニア発明に関する特許が、昨年、米国（ＵＳ８０４８９９９ Nuclear reprogramming factor）、欧州（ＥＰ１９７０４４６ Nuclear reprogramming factor）で相次いで成立した。その権利範囲は、欧州が、３遺伝子ファミリー又は遺伝子産物、２遺伝子ファミリー及びサイトカインで最も広く、米国が単離された３遺伝子ファミリー又は単離された２遺伝子ファミリー及びサイトカインと次に広く、日本は４遺伝子そのもの、３遺伝子及び塩基性繊維芽細胞成長因子そのもののみが認められた（特許 4183742 誘導多能性幹細胞の製造方法、特許 4411362 誘導多能性幹細胞の製造方法、特許 4411363　誘導多能性幹細胞からの体細胞の製造方法)。この権利範囲の違いは、日米欧の記載要件の違いと欧州のパイオニア特許により一般化した権利を与えるという審査基準の規定によるものと考えられた。

しかしながら、最も広い権利である欧州特許については、今年５月４日に異議申立がなされた。したがって、最も広い欧州の iPS 細胞特許が有効に維持されるかはまだ不明な状態にある。

一方、最も狭い権利しか成立しなかった日本においても、新たに特許が成立

した（特許 5098028　核初期化因子）。そこでこの日本特許、欧州異議申立について検討した。

２－２　日本特許 5098028 の検討

日本特許 5098028 は PCT/JP2006/324881 を日本移行した特願 2007-550210 について、４つの分割出願がなされているが、その分割の元となった原出願である。その審査経緯は以下の通りである。

2008.2.7　　日本語国際公開
2009.12.2　　審査請求書提出
2011.3.30　　手続補正書
2011.4.5　　手続補正書
2012.3.13　　拒絶理由通知書
2012.5.9　　応対記録
2012.5.11　　意見書、補正書提出
2012.5.14　　手続補足書
2012.6.26　　拒絶理由通知書
2012.7.30　　意見書、補正書提出
2012.8.28　　特許査定

2009 年 12 月に審査請求し、その２年４か月後に拒絶理由通知が発せられ、その後２回の応答を経て、最初の拒絶理由から約５カ月で登録査定となっている。そこでこれらの拒絶理由と応答について検討する。

２－２－１　国際特許出願時の特許請求の範囲

【請求項１】

体細胞の核初期化因子であって、下記の３種類の遺伝子：Ｏｃｔファミリー遺伝子、Ｋｌｆファミリー遺伝子、及びＭｙｃファミリー遺伝子の各遺伝子産物を含む因子。

【請求項２】

下記の３種の遺伝子：Oct３/４、Klf４、及びｃ－Myc の各遺伝子産物を含む請求項１に記載の因子。

【請求項３】

下記の遺伝子:Sox ファミリー遺伝子の遺伝子産物をさらに含む請求項１又は２に記載の因子。

【請求項４】

Sox２の遺伝子産物を含む請求項３に記載の因子。

【請求項５】
　Myc ファミリー遺伝子の遺伝子産物とともに、あるいは Myc ファミリー遺伝子の遺伝子産物に換えてサイトカインを含む請求項１ないし４のいずれか１項に記載の因子。
【請求項６】
　サイトカインが bFGF 及び／又は SCF である請求項５に記載の因子。
【請求項７】
　下記の遺伝子：TERT 遺伝子の遺伝子産物をさらに含む請求項１ないし６のいずれか１項に記載の因子。
【請求項８】
　下記の遺伝子：SV40　Large T antigen、HPV16E6、HPV16E7 及び Bmi1 からなる群から選ばれる１種以上の遺伝子の遺伝子産物をさらに含む請求項１ないし７のいずれか１項に記載の因子。
【請求項９】
　Fbx15、Nanog、Eras、ECAT15-２、Tcl１、及びβ-catenin からなる群から選ばれる１種以上の遺伝子の遺伝子産物をさらに含む請求項１ないし８のいずれか１項に記載の因子。
【請求項１０】
　ECAT１、Esg１、Dnmt３L、ECAT８、Gdf３、Sox15、ECAT15-１、Fthl17、Sall４、Rex１、UTF１、Stella、Stat３及び Grb２からなる群から選ばれる１種以上の遺伝子の遺伝子産物をさらに含む請求項１ないし９のいずれか１項に記載の因子。
【請求項１１】
　体細胞の核初期化により誘導多能性幹細胞を製造する方法であって、体細胞に対して請求項１ないし１０のいずれか１項に記載の核初期化因子を接触させる工程を含む方法。
【請求項１２】
　体細胞がヒト細胞である請求項１１に記載の方法。
【請求項１３】
　請求項１１又は１２に記載の方法により得られた誘導多能性幹細胞。
【請求項１４】
　請求項１３に記載の誘導多能性幹細胞から分化誘導された体細胞。
【請求項１５】
　細胞の分化能及び／又は増殖能を改善する方法であって、細胞に対して請求項１ないし１０のいずれか１項に記載の核初期化因子を接触させる工程を含む方法。

【請求項１６】
　細胞がヒト細胞である請求項１５に記載の方法。
【請求項１７】
　請求項１５又は１６に記載の方法により得られた細胞。
【請求項１８】
　請求項１７に記載の細胞から分化誘導された体細胞。

２－２－２　自発補正（2011.3.30）　請求項全文
【請求項１】
　Oct ファミリー遺伝子、Klf ファミリー遺伝子、Myc ファミリー遺伝子および Sox ファミリー遺伝子を体細胞に導入する工程を含む、誘導多能性幹細胞の製造方法。
【請求項２】
　Oct ファミリー遺伝子、Klf ファミリー遺伝子および Sox ファミリー遺伝子が導入された体細胞を塩基性線維芽細胞増殖因子の存在下で培養する工程を含む、誘導多能性幹細胞の製造方法。
【請求項３】
　下記の工程（１）および（２）:
（１）Oct ファミリー遺伝子、Klf ファミリー遺伝子、Myc ファミリー遺伝子および Sox ファミリー遺伝子を体細胞に導入することにより誘導多能性幹細胞を得る工程、
及び
（２）上記工程（１）で得られた誘導多能性幹細胞を分化誘導する工程、
を含む、体細胞の製造方法。
【請求項４】
　下記の工程（１）および（２）:
（１）Oct ファミリー遺伝子、Klf ファミリー遺伝子および Sox ファミリー遺伝子が導入された体細胞を塩基性線維芽細胞増殖因子の存在下で培養することにより誘導多能性幹細胞を得る工程、及び
（２）上記工程（１）で得られた誘導多能性幹細胞を分化誘導する工程、
を含む、体細胞の製造方法。
【請求項５】
　Oct ファミリー遺伝子が Oct３/４、Oct１Ａおよび Oct６のいずれかである、請求項１～４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項６】
　Klf ファミリー遺伝子が Klf１、Klf２、Klf４および Klf５のいずれかである、

請求項１～４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項７】
　Myc ファミリー遺伝子がｃ-Myc、N－Myc およびＬ－Myc のいずれかである、請求項１～４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項８】
　Sox ファミリー遺伝子が Sox１、Sox２、Sox３、Sox７、Sox１５、Sox１７および Sox１８のいずれかである、請求項１～４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項９】
　体細胞がヒト細胞である、請求項１～８のいずれか１項に記載の方法。

この自発補正では、国際出願で記載されていた遺伝子産物の記載を削除し、Oct ファミリー遺伝子、Klf ファミリー遺伝子、Ｍｙｃファミリー遺伝子および Sox ファミリー遺伝子を体細胞に導入する工程を含む、誘導多能性幹細胞の製造方法（請求項１）と、Oct ファミリー遺伝子、Klf ファミリー遺伝子および Sox ファミリー遺伝子が導入された体細胞を塩基性線維芽細胞増殖因子の存在下で培養する工程を含む、誘導多能性幹細胞の製造方法（請求項２）及び、それらから分化誘導させる工程を含む体細胞の製造方法（請求項３、４）という請求項となっている。すなわち、この補正により、遺伝子産物の権利化は諦め、遺伝子ファミリーまでの権利取得を目指す請求項となっている。

２－２－３　上申書提出（2011.4.5）
　上申書により、詳細なデータを提出し、請求項に係る発明が実施可能であることを主張している。

２－２－４　最初の拒絶理由通知の内容
　ⅰ．36 条 4 項１号違反、36 条 6 項 1 号違反
　　ファミリー遺伝子の全長アミノ酸配列の同一性は２０～５０％程度であり、また、進化的に類縁のある遺伝子（パラログ）同士は機能が分かれていることも多いことが技術常識である。各ファミリー遺伝子が同様の機能を有するかは不明であり、どのようなファミリー遺伝子を用いればよいのかも不明である。発明の詳細な説明の記載から請求項１～９に係る発明の範囲まで拡張ないし一般化できるともいえない。よって、この出願の発明の詳細な説明は、当業者が請求項１～９に係る発明を実施することができる程度に明確かつ十分に記載されていない。
　また、請求項１～９に係る発明は、発明の詳細な説明に記載したものでない。
　ⅱ．36 条 6 項 2 号違反

各ファミリー遺伝子については数個があげられているのみで、ファミリーの明確な定義づけがされていない。従ってファミリー遺伝子にどのような遺伝子が含まれるか不明確である。よって請求項１～９に係る発明は明確でない。

２－２－５　意見書・補正書（2012.5.11）

ｉ．補正後の請求項

【請求項１】

下記の（１）、（２）、（３）および（４）の遺伝子：

（１）Oct３/４遺伝子、

（２）Klf２遺伝子およびKlf４遺伝子から選択される遺伝子、

（３）ｃ－Myc遺伝子、Ｎ－Myc遺伝子、Ｌ－Myc遺伝子およびＴ５８Ａ遺伝子から選択される遺伝子、および

（４）Sox１遺伝子、Sox２遺伝子、Sox３遺伝子、Sox１５遺伝子およびSox１７遺伝子から選択される遺伝子を体細胞に導入する工程を含む、誘導多能性幹細胞の製造方法であって、初期化される体細胞において前記遺伝子のいずれかが発現している場合には、該遺伝子は導入する遺伝子から除かれていてもよい、前記製造方法（ただし、Oct３/４遺伝子、Klf４遺伝子、ｃ－Myc遺伝子およびSox２遺伝子を体細胞に導入する場合を除く）。

【請求項２】

下記の（１）、（２）および（３）の遺伝子：

（１）Oct３／４遺伝子、

（２）Klf２遺伝子およびKlf４遺伝子から選択される遺伝子、および

（３）Sox１遺伝子、Sox２遺伝子、Sox３遺伝子、Sox１５遺伝子およびSox１７遺伝子から選択される遺伝子が導入された体細胞を塩基性線維芽細胞増殖因子の存在下で培養する工程を含む、誘導多能性幹細胞の製造方法であって、初期化される体細胞において前記遺伝子のいずれかが発現している場合には、該遺伝子は導入されていなくてもよい、前記製造方法（ただし、Oct３／４遺伝子、Klf４遺伝子およびSox２遺伝子が導入された体細胞は前記体細胞から除かれる）。

【請求項３】

下記の工程（１）および（２）：

（１）請求項１記載の製造方法により誘導多能性幹細胞を得る工程、及び

（２）上記工程（１）で得られた誘導多能性幹細胞を分化誘導する工程、

を含む、体細胞の製造方法。

【請求項４】

下記の工程（１）および（２）：
（１）請求項２記載の製造方法により誘導多能性幹細胞を得る工程、及び
（２）上記工程（１）で得られた誘導多能性幹細胞を分化誘導する工程、
を含む、体細胞の製造方法。
【請求項５】
体細胞がヒト細胞である、請求項１～４のいずれか１項に記載の方法。

この補正により、実際に iPS 細胞を樹立できたと発明の詳細な説明に記載がある具体的な遺伝子群に限定している。ファミリーという上位概念で権利取得するのは難しいと判断したと思われる。

２－２－６　最後の拒絶理由通知

請求項１（３）に「Ｔ５８Ａ遺伝子」なる記載があるが、具体的にどのようなポリペプチドをコードする遺伝子を示しているのか明瞭でない。なお、「Ｔ５８Ａ」について、ｃ－Ｍｙｃの変異体であることが明らかになるように補正された場合は、当該拒絶理由は解消する。

Ｔ５８Ａが不明瞭なので、36 条 6 項 2 号違反の拒絶理由が来ている。審査官の言うとおりに補正すれば拒絶理由が解消する旨記載されている。

２－２－７　意見書・補正書提出

c－Ｍｙｃ遺伝子の変異体であるＴ５８Ａ遺伝子から選択される遺伝子
と、Ｔ５８Ａ遺伝子がｃ－Ｍｙｃ遺伝子の変異体であることを請求項に記載した。

２－２－８　特許査定（2012.8.28）

特許査定が下りた（起案日 2012.8.22）

２－２－９　まとめ

欧米ではファミリー遺伝子まで権利範囲が認められているが、日本では、かなり厳しく、実施例に記載のある範囲までしか拡張できない結果となっている。日本で広い権利を取得するには、ファミリーを合理的に定義し、ファミリーの範囲を明確にする必要があると思われる。

それに対し、欧米ではその必要もなく、広い権利が認められている。やはり、日本の記載要件は欧米に比べ厳しいのではないかと思われた。

それでも、欧州のように、パイオニア発明に対してはより広い権利範囲を与

えることが必要ではないかと考えられる。ただ、欧米は核初期化因子という縛りがあるために、ファミリー遺伝子まで認められた可能性がある。ファミリー遺伝子の中で核初期化機能を有する因子という機能的な縛りがあるため実施可能要件を自ら満たすとも言える。

日本の請求の範囲は核初期化因子ではなく、iPS 細胞の製造方法で請求の範囲を書いていることから iPS 細胞が製造できた遺伝子しか認められていない。

２－３　欧州特許異議申立の検討

欧州特許 EP1970446 Nuclear reprogramming factor(出願番号:No.06834636.0) については、本年５月４日に異議申立がなされており、京大の応答期限が１２月１２日（２カ月延長された）となっているため本答申の提出時までには結論は出ないと考えられる。

欧州異議申立の理由の概要は以下のとおりである。

欧州特許 EP1970446 の請求項

１． a）Oct ファミリー遺伝子または遺伝子産物、
b）Klf ファミリー遺伝子または遺伝子産物、および、
c）Myc ファミリー遺伝子または遺伝子産物、および／またはサイトカイン、
を含む体細胞の核初期化因子。

２．下記の 3 種の遺伝子： Oct3/4、Klf4、及び c- Myc の各遺伝子または遺伝子産物を含む請求項１に記載の因子。

３．Sox ファミリー遺伝子または遺伝子産物をさらに含む請求項１又は２に記載の因子。

４．下記の遺伝子または遺伝子産物:Sox2 を含む請求項３に記載の因子。

５．サイトカインが bFGF 及び／又は SCF である請求項１～４のいずれか一項に記載の因子。

６．下記の 3 種の遺伝子： Oct3/4、Klf4、及び c-Myc の各遺伝子または遺伝子産物、および bFGF を含む請求項１～５のいずれか一項に記載の因子。

７．下記の遺伝子または遺伝子産物：TERT をさらに含む請求項１～６のいずれか一項に記載の因子。

８．SV40 Large T antigen, HPV16 E6、 HPV16 E7、及び Bmil からなる群から選ばれる１種以上の遺伝子または遺伝子産物をさらに含む請求項１～７のいずれか一項に記載の因子。

９．Fbxl5、Nanog、ERas、ECAT15-2、Tcl1、及びβ-catenin からなる群

から選ばれる１種以上の遺伝子または遺伝子産物をさらに含む請求項１～８のいずれか一項に記載の因子。

１０．ECAT1、Esgl、Dnmt3L、ECAT8、Gdf3、Soxl5、ECAT15－1、Fthll7、Sall4、Rexl、UTF1、Stella, Stat3、及び Grb2 からなる群から選ばれる１種以上の遺伝子または遺伝子産物をさらに含む請求項１～９のいずれか一項に記載の因子。

１１．Klf4 の代わりに Klf2 を含む請求項１～１０のいずれか一項に記載の因子。

１２．Sox2 の代わりに、Sox1、Sox3、Sox15、及び Sox17 からなる群から選ばれるいずれか一つを含む請求項１～１０のいずれか一項に記載の因子。

１３．c-Myc の代わりに L-Myc または N-Myc を含む請求項１～１０のいずれか一項に記載の因子。

１４．請求項１～１３のいずれか一項に記載の初期化因子の、体細胞の初期化への使用。

(1)異議申立人　Olswang LLP（特許事務所）

(2)異議理由の概要

異議理由は、優先権の有効性、新規性、進歩性についてである。

１）　優先権の有効性について

1.　全ての請求項は、優先権書類に基礎を置いてないので優先権の利益を受けられない（優先日：2005 年 12 月 13 日、PCT 出願日：2006 年 12 月 6 日）。先の出願では、c-Myc 遺伝子が必須と記載されているが、後の出願の請求項では c-Myc が任意要素となっている。また、優先権書類にはサイトカインについて記載されていないので、請求項のサイトカインは優先権書類でサポートされていない。従って、全ての請求項は優先権書類に基づかないため、Article 123 (2) 違反である。

高橋和利京大講師の論文 D1（Cell 126, 663-676; Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors）が 2006 年 8 月 25 日に発行されている（電子版では 2006 年 8 月 10 日に公開）。これは後の出願日 2006 年 12 月 6 日より前であり、完全な先行技術を構成する。請求項１～４、９、１０及び１４は上記論文 D1 により新規性が無い。また、D1 は進歩性評価においても非常に近い先行技術となる。

2. 考察

確かに優先権主張の基礎となった山中先生の出願（特願 2005-359537：核初期化因子）の段落【００１４】には、「これら３種

の遺伝子産物の組み合わせが核初期化に必須である」と記載されており、その前に、Oct3/4、Klf4 及び c-Myc 遺伝子が３種の遺伝子である旨記載されている。従って、c-Myc を含まない請求項は優先権書類の記載と矛盾するため、優先権の利益を受けられないという主張は合理性があると思われる。

欧州特許の請求項１は以下の通りであり、Myc family 遺伝子又は遺伝子産物及び／又はサイトカインとなっており、c-Myc 遺伝子は任意要素であり、サイトカインと置き換えることも可能とされている。

1. A nuclear reprogramming factor for a somatic cell, which comprises:

a) an Oct family gene or gene product;

b) a Klf family gene or gene product; and

c) a Myc family gene or gene product, and/or a cytokine.

また、高橋講師の論文は正に iPS 細胞を作成した基本論文であり、この文献が先行技術とされると iPS 細胞特許は主要な部分が新規性無とされる可能性がある。従って、優先権が認められるかどうかにより、欧州特許の運命は大きく変わることになると思われる。

その他の優先権主張が認められないと主張されている事項は、請求項３の「Sox family gene or gene product」(優先権書類では「gene product of Sox2」の記載のみ)、請求項５の bFGF and/or SCF、請求項６の bFGF と「Oct3/4, Klf4, Sox2 and bFGF」の組み合わせ、請求項７の「gene or gene product: TERT」、請求項８の遺伝子又は遺伝子産物、請求項１１－１３の「Klf12, Sox1, Sox3, Sox15, Sox17, L-Myc or N-Myc」である。

２）　新規事項追加

1. 明細書には、NRF は次の各々の３遺伝子の遺伝子産物を含むとのみ記載されており、遺伝子を含むという記載が含まれていない。従って、請求項の、「遺伝子及び／又は遺伝子産物」という記載は明細書にサポートされていない。
2. 考察

実際日本の明細書も遺伝子と遺伝子産物を明確に区別せず、全て遺伝子産物で記載している。専門家から見れば上の主張は合理性があり、遺伝子を請求項に含めることの論理的な説明が必要になると思われる。

３）　新規性

1. D1（先の高橋講師の Cell の論文）は発明者の論文であり、2006

年８月25日に公開されている。この論文に請求項１～４の発明が全て開示されているため、欧州特許は新規性がない。また、同じ文献により、請求項９，１０，１４も新規性が無い。

2. 体細胞の核を、核を除去した卵母細胞に移植することで初期化できる（D2,D3）ことや、体細胞と胚性幹細胞を融合させることで初期化できるが、核の中には遺伝子が、体細胞の中には、遺伝子及び遺伝子産物が含まれている。また、核を除去した卵母細胞には欧州特許の遺伝子産物が全て発現していると予想される。それゆえ欧州特許の遺伝子及び遺伝子産物は新規性が無い。
3. 考察

確かに、核や細胞質全体として遺伝子や遺伝子産物を導入すれば核が初期化されることは先行文献に記載されており、新規性がないという主張には合理性があると思われる。米国では体細胞とES細胞を融合させて初期化した文献を根拠に拒絶理由が出され、「単離した（isolated)」という語を遺伝子の前に付けて権利化している。欧州特許の場合も、「単離した」を付ける必要がある可能性がある。

４）　進歩性の欠如

1. 脱分化だけで、分化できなれば NRF とは言えず、発明の目的を達成しているとは言えないまた、Oct3/4＋Klf4＋サイトカインで脱分化や分化多能性を誘導できる証拠がない。実施例５では、c-Myc の代わりにサイトカインが使用でき、Oct3/4+Klf4+Sox2+bFGF も使用できると記載されているが、請求項１は４因子のうち２つを必須要素として含んでいる。
2. 請求項７，８は後の文献で必要ないことがわかっているので技術的効果がない。請求項１０も技術的効果がない。
3. 多くの体細胞では Sox2 が iPS 細胞の誘導に必要で、請求項１には Sox2 が含まれないので、全ての細胞から iPS 細胞ができる構成ではない。
4. In vivo の限定が無いので、医療方法も含まれる。
5. Isolated がついていないので、自然界で起こっている現象も含まれる。
6. 考察

上記の議論はほぼ全て合理的ではあるが、反論が可能と思われるものも含まれると考えられる。例えば、１については、初期化因子なので、分化まではもともと含まれていないとも考えられる。実際、初期

化過程と増殖過程のうち、初期化部分を可能にしたのがこの発明であると審査過程で述べている。請求項７，８，１０は削除しても問題ないと思われる。Sox2 遺伝子がないと iPS 細胞ができない体細胞があるとすれば、Sox2 の限定も必要かも知れないが、今後 Sox2 無でもそういう細胞で iPS 細胞ができるようになる可能性も無いとは言えない。医療方法と isolated については合理性があるので、補正で対処すればよいと思われる。

5)まとめ

厳密に考えると、優先権主張の基礎出願に記載がされていないことについて請求項に記載しているので、優先権が有効ではない、という主張は認められる可能性がある。もし優先権主張が認められないと、発明者自身である高橋講師と山中教授の論文が先行文献になるので、非常に厳しい状況になる可能性がある。この部分の攻防が最も大変ではないかと思われる。

欧州の審査基準では、パイオニア発明には改良発明よりも、より一般化した権利を与える旨規定されているので、明細書の記載の範囲を超えて権利を付与される場合が起こりうる。それと優先権主張の要件をどう整合させるかが問題と思われる。

－４　iPS 細胞特許の考察

山中教授の日本特許は今年の８月にある程度広い権利が成立したが、やはり、明細書に記載のある遺伝子に限定された範囲までであった。明細書中に遺伝子ファミリーの範囲を明確に定義していれば、ファミリー遺伝子まで認められた可能性もあると思われる。

欧州特許は日米欧の中では一番広い権利が成立したが、今年５月に異議申立がなされ、優先権主張が有効かどうか、新規性、進歩性の問題、医療方法も含まれる等様々な問題が指摘されている。異議申立の応答期限は最初１０月１２日であったが、出願人側からの要請で２カ月延長され、１２月１２日期限となっている。そのため本答申には反論については記載が間に合わないが、ノーベル賞を受賞した基本技術の特許だけに、今後の異議申立の推移が注目される。

３．心筋細胞再生治療関連特許の検討（担当　黒崎　文枝）

３－１　まえがき

「細胞シートによる再生医療実現プロジェクト」（研究代表者：東京女子医科大学、岡野光夫教授）は、平成20年に厚生労働省が提唱したスーパー特区の再生医療分野の課題の一つである。このプロジェクトは、温度低下するだけで脱着可能な温度応答性高分子（ポリ（N-イソプロピルアクリルアミド：PIPAAm）を用いて製造された細胞シートにより再生医療を実現しようとするものである。

澤芳樹教授の下、この「心筋再生パッチ」を用いた拡張型心筋症を適応症とした臨床研究が行われ、第１例患者が補助人工心臓を外して退院するなどの成果が得られている。

この心筋再生パッチ技術に関連する特許の国際戦略を調査すべく、IPDLを用いて、「”細胞シート” OR “岡野光夫AND心筋” OR “澤芳樹AND心筋” OR “セルシードAND心筋”」の検索式により全文検索を行った。ヒットした文献のうち、日本において特許成立し、欧州及び米国へ出願されている下記２つの出願を抽出し、日本、欧州及び米国における権利取得状況及び審査状況について調査を行ったので、本書では、その結果を報告する。

≪出願１≫
【発明の名称】心筋様細胞シート、３次元構造体、心筋様組織及びそれらの製造法
【出願人／特許権者】株式会社セルシード
【発明者】岡野　光夫，清水　達也，大和　雅之，菊池　明彦
【出願日】2001年7月2日
【国際出願番号】PCT/JP2001/05722
【出願番号】
【日本】特願2002-513872，特願2010-168577
【欧州】01945762.1，10181984.5
【米国】10/333473
【登録番号（登録日）】
【日本】特許第4679795号（2012年2月10日），特許第5086398号（2012年9月14日）
【欧州】1302535（2011年1月19日），2275532（2012年6月6日）
【優先権番号／優先国】特願2000-221385／日本
【優先日】2000年7月21日

≪出願２≫
【発明の名称】三次元組織構造体

【出願人／特許権者】株式会社セルシード
【発明者】松田　暉、澤　芳樹、竹谷　哲、宮川　繁
【出願日】2004 年 2 月 2 日
【国際出願番号】PCT/JP2004/001024
【出願番号】
【日本】特願 2006-519056, 特願 2009-223536, 特願 2012-0087825
【欧州】04707319.2, 10183361.4, 10183373.9
【米国】10/567728
【登録番号（登録日)】
【日本】特許第 4943844 号（2012 年 3 月 9 日）
【優先権番号／優先国】特願 2003-285476／日本
【優先日】2003 年 8 月 1 日

３－２　岡野光夫らの出願：出願１
３－２－１　概略
本願は、2000 年 7 月 21 日付け日本出願に基づく優先権を主張して、2001 年 7 月 2 日に岡野光夫によって国際出願されたものである。この国際出願は、その後、㈱セルシードにより、日本、欧州及び米国に移行されている。
この出願の出願当初の請求項は、請求項 1, 3, 4, 10, 12 が心筋様培養細胞シート、請求項 2～4, 10, 12 が心筋様培養細胞の３次元構造体、請求項 5, 7～9 が心筋様細胞シートの製造法、請求項 6～9 が心筋様細胞の３次元構造体の製造法、請求項 11, 12 が血管を形成させた心筋様組織、請求項 13 が心疾患、その他の循環器関連疾患、或いは消化器関連疾患の治療法、に係るものであり、この発明の目的は、収縮弛緩機能、細胞間の電気的結合及び配向を保持した心筋組織の細胞からなる心筋様培養細胞シート及びその３次元構造体を提供すること、及び、培養された心筋様細胞シートを高分子膜に密着させるとともにディスパーゼのような酵素で処理することなく環境温度を変化させることにより、培養・増殖させた細胞シートを容易にかつその形態を崩さずに支持体表面から剥離・回収することができる方法、及びそれらを３次元構造体とする方法を提供することにある。
（１）日本出願の経過
2002 年 12 月 11 日　国内移行，新規性の喪失の例外証明書提出書
2007 年 3 月 27 日　出願審査請求
2008 年 11 月 5 日　拒絶理由通知（特許法 29 条 1 項柱書，3 号，2 項、32 条）
2009 年 1 月 5 日　意見書，補正書
2010 年 4 月 27 日　拒絶査定（特許法 29 条 2 項）

2010年 7月27日　不服審判請求，補正書
2010年 9月10日　理由補充
2010年 9月17日　前置移管
2010年12月17日　応対記録
2010年12月21日　拒絶理由通知＜最後＞（特許法29条2項，36条6項1号）
2010年12月27日　意見書，補正書
2011年 1月21日　特許査定
2011年 2月10日　登録

また、2010年7月27日付け不服審判請求と同時に、分割出願がなされている。この分割出願については、新規性欠如、進歩性欠如及びサポート違反の最初の拒絶理由通知を受けたが、補正書とともに意見書を提出することにより、特許査定が送達され、特許が付与されている。

（２）欧州出願の経過

2003年 1月21日　国内移行，補正書
2007年 7月31日　拡張サーチレポート
2008年 9月18日　庁指令（EPC 53条(c)，(3)，54条(2)，84条）
2009年 5月27日　意見書，補正書
2009年 9月10日　庁指令（EPC 54条(2)，56条，84条）
2010年 1月20日　意見書，補正書
2010年 2月9日　庁指令
2010年 7月27日　特許予告通知
2010年12月23日　特許決定
2011年 1月19日　登録

また、特許予告通知後、2010年9月29日付で分割出願がなされた。この分割出願は、拡張サーチレポートにおいて、親出願の最初の拒絶理由通知を引用する拒絶理由を受けたが、補正書とともに意見書を提出することにより、特許が付与されている。

（３）米国出願の経過

2003年 1月21日　国内移行
2003年 7月15日　補正書
2006年 2月15日　non-final OA (35 USC 112-1st,-2nd, 102 (a), (b), 103)
2006年 8月15日　意見書，補正書
2006年11月15日　final OA (35 USC 102 (a), 103)

2007年 5月15日　Notice of Appeal，意見書，補正書
2007年10月 3日　Advisory Action
2007年10月15日　RCE
2008年 1月 9日　non-final OA (35 USC 101, 112-1st, 102 (b), 103)
2008年 7月 9日　意見書，補正書
2008年 7月11日　追加意見書，補正書
2008年10月15日　non-final OA (35 USC 112-1st, 103)
2009年 4月15日　意見書，補正書
2009年 4月16日　追加意見書
2009年8月20日　final OA (35 USC 103)
2010年 2月22日　Notice of Appeal，意見書，補正書
2010年 4月 6日　Advisory Action
2010年 9月22日　RCE
2010年12月23日　non-final OA (35 USC 112-1st, 103)
2011年 6月22日　意見書，補正書
2012年 3月 8日　Notice of Appeal
2012年10月5日　RCE，補正書
現在に至る。

３－２－２　国際出願の詳細：PCT/JP2001/005722

2001年7月2日付の国際出願の請求項は下記の13項であった。

【請求項１】収縮弛緩機能、細胞間の電気的結合及び配向を保持した心筋組織の細胞からなる心筋様培養細胞シート。

【請求項２】血管内皮細胞による管腔形成及び／または心外膜様の一層の細胞層を外層に有しており、収縮弛緩機能を保持し、３次元に細胞間の電気的結合及び配向を保持した心筋様培養細胞の３次元構造体。

【請求項３】蛋白質分解酵素による処理を施されることなく基材から剥離された請求項１または２記載の心筋様培養細胞シートまたは３次元構造体。

【請求項４】基材から剥離された心筋様培養細胞シートまたは３次元構造体を特定方向に引き伸ばすことで特定方向に配向された請求項１、２または３記載の心筋様培養細胞シートまたは３次元構造体。

【請求項５】水に対する上限もしくは下限臨界溶解温度が０～８０℃である温度応答性ポリマーで基材表面を被覆した細胞培養支持体上で培養し、その後
（１）培養液温度を上限臨界溶解温度以上又は下限臨界溶解温度以下とし、さらに必要に応じ
（２）培養された細胞シートを高分子膜に密着させ、

（３）そのまま高分子膜と共に剥離する
ことを含む心筋様細胞シートの製造法。
【請求項６】請求項５で得られた心筋様細胞シートを再び細胞培養支持体、温度応答性ポリマーで表面を被覆した細胞培養支持体、高分子膜、或いは細胞シートに付着させ、重ね合わせていくことを含む心筋様細胞の３次元構造体の製造法。
【請求項７】剥離が蛋白質分解酵素による処理が施されていない、請求項５または６記載の心筋様細胞シートの製造法または心筋様細胞の３次元構造体の製造法。
【請求項８】温度応答性ポリマーが、ポリ（Ｎ－イソプロピルアクリルアミド）である、請求項５または６記載の心筋様細胞シートの製造法または心筋様細胞の３次元構造体の製造法。
【請求項９】高分子膜が、親水化処理が施されたポリビニリデンジフルオライドからなる膜、ポリウレタン、スパンデックスからなるメッシュ、及びストッキネット状素材から選択される、請求項５または６記載の心筋様細胞シートの製造法または心筋様細胞の３次元構造体の製造法。
【請求項１０】請求項５～９のいずれか１項記載の製造法によって得られた心筋様細胞シートまたは心筋様細胞の３次元構造体。
【請求項１１】請求項１～４及び１０のいずれか１項記載の心筋様細胞シートまたは心筋様細胞の３次元構造体を生体内に埋入することで、当該心筋様細胞シートまたは心筋様細胞の３次元構造体自身に内在している血管内皮細胞による管腔形成、及び／または埋入された周囲の組織内の血管内皮細胞を進入させかつ管腔を形成させることにより血管を形成させた心筋様組織。
【請求項１２】心疾患、その他の循環器関連疾患、或いは消化器関連疾患の治療用の請求項１～４及び１０のいずれか１項記載の心筋様細胞シート若しくは心筋様細胞の３次元構造体または請求項１１記載の心筋様組織。
【請求項１３】請求項１～４及び１０のいずれか１項記載の心筋様細胞シート若しくは心筋様細胞の３次元構造体または請求項１１記載の心筋様組織を利用した心疾患、その他の循環器関連疾患、或いは消化器関連疾患の治療法。
　国際調査機関は日本特許庁であり、請求項 1-3, 12 については、五島の文献（循環制御, 1993, 14 巻, 4 号, 495-500 頁）から新規性又は進歩性なし、請求項 5-8, 10, 12 については、本発明者の大和らの文献（東京女子医科大学総合研究所紀要, 1998, 19 巻, 173-174 頁）から新規性又は進歩性なしとされた。また、優先日後及び出願前に公知となった文献として、本発明者の清水の文献（Tissue Engineering, 2001, vol.7, no. 2, pp. I41-51, Cardiac tissue engineeringーバイオマテリアルを用いた心筋組織の構築, 医学のあゆみ, 2000

年 10 月 21 日, 195 巻, 3 号, p.203-204）が引用され、優先権が認められない場合は、これら文献から新規性又は進歩性がないとされた。

３－２－３　日本出願の詳細：特願 2002-513872

（１）最初の拒絶理由通知、及び、これに対する出願人の対応

2002 年 12 月 11 日に国際出願の内容で日本移行し、この際、2000 年 6 月 30 日に「第 3 回日本組織工学会プログラム・抄録集」（2000 年 5 月発行）10 頁、42 頁に発表されたことに基づく新規性喪失の例外の適用を受けるための手続がなされた。2008 年 11 月 5 日に、最初の拒絶理由が通知された。内容の概略は下記のとおりである。

理由 1：特許法 29 条 1 項柱書違反（請求項 13）

請求項 13 に係る発明は、ヒトの治療方法に関する発明である。

理由 2：特許法 32 条違反（請求項 11）

請求項 11 に記載されている「生体内」にはヒトが含まれないことが明確に記載されておらず、請求項 11 に係る発明は、「心筋様細胞の３次元構造体」をヒトの生体内に埋入することを構成の必須要件とする発明であり、「公の秩序、善良の風俗を害するおそれがある発明」に該当すると認められる。

理由 3：新規性欠如（請求項 1～3）

五島の文献 1（循環制御, 1993, 14 巻, 4 号, 495-500 頁）には、自動拍動している心筋細胞が互いに接触してなる細胞シートが記載されている。また、この細胞シートを構成する心筋細胞の拍動リズムは同期していること、細胞間に電気的抵抗の低い接合（ギャップ結合）が形成されていることも記載されている。してみると、請求項 1～3 に係る発明は、文献 1 に記載された発明と区別がつかない。

理由 4：進歩性欠如

（i）　請求項 1～8, 10～13

請求項 5, 7～8, 10 に係る発明が温度応答性ポリマーを用いて細胞を培養し、臨界溶解温度以上又は以下とすることで細胞を剥離するのに対し、五島の文献 1 に記載された発明はそのような手段を用いていない点で相違する。本願発明者の大和らの文献 2（東京女子医科大学総合研究所紀要, 1998, 19 巻, 173-174 頁）には、約 37℃では疎水性を示し、32℃で親水性を示す温度応答性ポリマーを用いた培養皿で細胞を培養し、37℃で培養して 32℃で細胞を回収することにより、トリプシン等を用いず非侵襲的な方法のみで培養細胞を回収できることが記載されている。より非侵襲的な手段で培養物を得ることは自明の課題であるから、文献 1 に記載された発明を文献 2 に記載された発明に適用することは当業者が容易に想到し得ることである。また、細胞シートを引っ張って配向性を持たせて用

いること、複数の細胞シートを積層して三次元構造体とすること、及び心筋様細胞シートや心筋様組織を心疾患や循環器疾患等の疾患治療に用いることは周知慣用の手段であり、この点にも格別の技術的困難性は見いだせないから、請求項 4, 6, 11〜13 についても同様である。また、その効果についても予想し得ない程度に顕著なものとも認められない。

(ii) 請求項 1〜13

本願発明者の菊池らの文献 3（J Biomater.Sci.Polymer Edn., 1998, Vol.9, No.12, p.1331-1348）には、温度応答性ポリマー状で細胞を二次元的に培養すること、単層の培養細胞を剥離し、移植する際の収縮防止にキチン膜を細胞に接着させて用いることが記載されている。してみれば、文献 1 に記載された発明を文献 3 に記載された発明に適用することは当業者が容易に想到し得ることである。また、その際にキチンに代えてポリビニリデンジフルオライド、ポリウレタン等の周知の親水性高分子を選択して用いること、及び必要に応じてメンブレン状、メッシュ状の素材を用いることも当業者が適宜なし得る程度のことにすぎない。また、細胞シートを引っ張って配向性を持たせて用いること、複数の細胞シートを積層して三次元構造体とすること、及び心筋様細胞シートや心筋様組織を心疾患や循環器疾患等の疾患治療に用いることは周知慣用の手段であり、この点にも格別の技術的困難性は見いだせない。そして、その効果についても予想し得ない程度に顕著なものとも認められない。

これに対し、2009 年 1 月 5 日、出願人は下記の応答を行った。

理由 1：特許法 29 条 1 項柱書違反

請求項 13 を心臓の収縮能の弱まった部位に移植することで心疾患を治療するために使用される、心筋様細胞シート、心筋様細胞の３次元構造体又は心筋様組織（補正後の請求項 14)、並びに、ヒト以外の動物における心疾患、その他の循環器関連疾患、或いは消化器関連疾患の治療法（補正後の請求項 15）へ補正した。

理由 2：特許法 32 条違反

当初の請求項 11 を「心筋様細胞シート又は心筋様細胞の３次元構造体自身に内在している血管内皮細胞による管腔を基に血管が形成した請求項 1~4 及び 10 のいずれか１項記載の心筋様細胞シート又は心筋様細胞の３次元構造体。(補正後請求項 12)」と、物としての発明が明確になるよう補正した。

理由 3：新規性欠如

出願人は、補正により、請求項に係る「心筋様細胞シート」に係る発明が、培養基材より剥離されたものであることを限定した。五島の文献 1 で示される技術は培養基材表面に付着した心筋細胞に関するものに過ぎない。本発明の心

筋様培養細胞シート又は３次元構造体とは基材表面より剥離されたものであり、それを心疾患、その他の循環器関連疾患、或いは消化器関連疾患の治療等に利用しようとするものであり、文献１とは全く異なる技術である。
理由４：進歩性欠如
(i)　文献 1～2 による請求項 1～8, 10～13 の拒絶について
　本願発明者の大和らの文献 2 で開示されている細胞は、ラット初代肝実質細胞、及び、血管内皮細胞だけであり、本発明で示される技術とは拍動している細胞シートをシート状の形態を壊さずに、さらに拍動等の機能、その電気的結合を保持したまま培養細胞シートを剥離させた場合にどのようなことになるかについては文献 1 及び 2 に全く言及も示唆もされていない。また、“細胞シートを引っ張って配向性を持たせて用いること”、“複数の細胞シートを積層して三次元構造体とすること”、及び“心筋様細胞シートや心筋様組織を心疾患、循環器疾患等の疾患治療に用いること”は、これらの行為は上述のように培養基材より剥離され、拍動等の機能、その電気的結合を保持した本発明の心筋様培養細胞シート又は３次元構造体を利用することでなされ得るものであり、周知慣用の手段とは言えない。
(ii)　文献 1, 3 による請求項 1～13 の拒絶について
　補正後の請求項 9 に記載された発明は、「高分子膜が、コラーゲンからなる膜、ポリウレタン、スパンデックスからなるメッシュ、及びストッキネット状素材から選択される、請求項 5 又は 6 記載の心筋様細胞シートの製造法又は心筋様細胞の３次元構造体の製造法。」に関するものである。コラーゲンからなる膜、ポリウレタン、スパンデックスからなるメッシュ、及びストッキネット状素材はいずれも収縮性を有するものであるのに対して、本願発明者の菊池らの文献 3 に記載されているキチン膜は全く収縮性を有さず、文献 3 には心筋様細胞シートの製造に好適な収縮性を有する膜を使用することを示唆する記載はない。したがって、たとえ当業者であっても、心筋様細胞シート又は心筋様細胞の３次元構造体の製造に際して、コラーゲンからなる膜、ポリウレタン、スパンデックスからなるメッシュ、及びストッキネット状素材という特定の膜を使用することは想到し得ない。

（２）拒絶査定
　2010 年 4 月 27 日付拒絶査定が送達された。備考欄には下記の判断が示されており進歩性欠如の理由が維持された。
　先の五島の文献 1 には、培養基材上で培養された細胞シートを構成する心筋細胞の拍動リズムは同期していること、細胞間に電気的抵抗の低い接合（ギャップ結合）が形成されていることが記載されているのであり、また非侵襲的手

段で基材からシートを剥離するのは自明の課題であるから、先の文献１に記載された発明の心筋シートについて、本願発明者の大和らの先の文献２に記載された発明の温度応答性ポリマーを用いた培養皿を適用することに格別の困難性があったとは認められない。また、先の文献１に記載された発明の細胞シートが非侵襲的に剥離された場合、拍動や電気的結合といった機能も維持されるであろうことは当業者であれば当然に期待し、また予測し得る程度の効果であると認められる。

高分子膜として、コラーゲンからなる膜、ポリウレタン、スパンデックスからなるメッシュ、及びストッキネット状素材から選択されるものを使用することについては、細胞あるいは細胞シートを担体上に担持して増殖させることにより三次元構造体や移植材料を製造すること、及びその際にコラーゲンからなる担体を用いることは広く行われることである（要すれば、米国オサイリス社の文献（WO99/03973）、米国ゴア社の文献（WO00/32749）等参照）から、この点に格別の技術的困難性があったとは認められない。また、その効果についても予想し得ない程度に格別顕著なものとも認められない。

（３）不服審判請求：不服 2010-016910

2010 年 7 月 27 日、㈱セルシードは、これを不服として審判請求をした。㈱セルシードは、審判請求の際に次の補正を行った。すなわち、請求項に係る物の発明を心筋様細胞シートに限定し、当該細胞シートが「蛋白質分解酵素による処理を施されることなく基材から剥離され」、さらに当該細胞シートの剥離をコラーゲンからなる膜、スパンデックスからなるメッシュ、ネット状、及びストッキネット状素材から選択される高分子膜に密着させて行うものに限定した。また、三次元構造体、及び、その製造法に係る発明は削除した。

そして、㈱セルシードは、以下の主張をした。五島の文献 1、及び、本願発明者の大和らの文献２は、心筋様細胞シートをコラーゲンからなる膜、スパンデックスからなるメッシュ、ネット状、及びストッキネット状素材から選択される高分子膜を使用して剥離することについて記載も示唆もしていない。従って、文献１及び文献２に記載された発明を組み合わせたとしても、補正後の心筋様細胞シートに係る発明に到達することはできない。米国オサイリス社の文献（WO99/03973）は、「この側面の別の態様として、MSCs は半固体又は固体マトリックスの生分解性媒体、又は心筋の損傷部位で半固体又は固体マトリックスになる生分解性媒体において投与される。例えば、該マトリックスは、(i)コラーゲン及びその前駆体、ポリ乳酸、又はポリグリコール酸のような損傷を受けた心筋部位で半固体のゲルを形成する注入可能な液体としてもよい。」と記載する。米国ゴア社の文献（WO00/32749）は、「ミクロ球はプレアジポサイト細胞懸濁液

と混合され、この混合物１００～２００μｌが各手段の長さ方向の中心線に沿ってコラーゲンスポンジに注入される。」と記載する。即ち、上記の米国オサイリス社・ゴア社の文献に記載されたコラーゲンは、膜を形成していないため、心筋様細胞シートの剥離に適用することはできないし、上記のような記載によっては、コラーゲンからなる膜を用いて心筋様細胞シートの剥離が可能であることを予測できない。従って、上記の米国オサイリス社・ゴア社の文献に記載された事項を参酌したとしても、本発明に到達することはできない。

さらに、本発明は、コラーゲンからなる膜、スパンデックスからなるメッシュ、ネット状、及びストッキネット状素材から選択される高分子膜を使用することによって、優れた効果を発揮する。例えば、高分子膜としてのメッシュと共に剥離された心筋様細胞シートは、培養皿表面に固定された細胞シートに比べて､収縮弛緩機能が著しく高いことが示されている(本明細書の図 12)。また、コラーゲンからなる膜と共に剥離された心筋様細胞シートも同様に、高い収縮弛緩機能を有することを示す（実験結果を参考資料として提出されている)。上記の効果は、コラーゲンからなる膜、スパンデックスからなるメッシュ、ネット状、及びストッキネット状素材から選択される収縮性のある高分子膜を使用することによって､心筋様細胞シートの自由度が高まることに基づいている(本明細書、16 頁､13～15 行目)。収縮性のないキチン膜を高分子膜として用いる、本願発明者の菊池らの文献 3､高分子膜についての記載がない五島の文献 1､及びその他の周知技術を参酌したとしても、当該効果を予測することは極めて困難である。

（４）前置審査

審判請求後、前置審査に移管された。前置審査において、審査官は、電話応対により㈱セルシードに補正の提案をし､㈱セルシードがこれを受け入れ､2010 年 12 月 21 日に最後の拒絶理由が通知された。この拒絶理由では、下記のとおり、進歩性欠如及びサポート要件違反が指摘されている。

理由１　進歩性欠如

先の五島の文献 1 には、自動拍動している心筋細胞が互いに接触してなる細胞シートが記載されている。また、この細胞シートを構成する心筋細胞の拍動リズムは同期していること、細胞間に電気的抵抗の低い接合（ギャップ結合）が形成されていることも記載されている。請求項 1, 2 に係る発明は､「剥離された心筋様細胞シート」であるから、高分子膜を心筋細胞シートに密着させて剥離を行ったのち高分子膜を除去してなる心筋細胞シートも包含するものである。また、請求項 3～11 に係る発明は､「必要に応じ」､培養された細胞シートを高分子膜に密着させて剥離することを含む心筋細胞シートの製造方法である

から、「培養された細胞シートを高分子膜に密着させて剥離する」工程を含まない心筋細胞シートの製造方法も包含するものである。請求項 1〜11 に係る発明が、蛋白質分解酵素による処理を施されることなく基材から剥離されるか、温度応答性ポリマーを用いて細胞を培養し、臨界溶解温度以上又は以下とすることで細胞を剥離するのに対し、文献１に記載された発明はそのような手段を用いていない点で相違する。上記相違点について検討する。先の本発明者の大和らの文献 2 には、約 37℃では疎水性を示し、32℃で親水性を示す温度応答性ポリマーを用いた培養皿で細胞を培養し、37℃で培養して 32℃で細胞を回収することにより、トリプシン等を用いず非侵襲的な方法のみで培養細胞を回収できることが記載されている。より非侵襲的な手段で培養物を得ることは自明の課題であるから、文献 1 に記載された発明を文献 2 に記載された発明に適用することは当業者が容易に想到し得ることである。また、細胞シートを引っ張って配向性を持たせて用いること、複数の細胞シートを積層して三次元構造体とすること、及び心筋様細胞シートや心筋様組織を心疾患や循環器疾患等の疾患治療に用いることは周知慣用の手段であり、この点にも格別の技術的困難性は見いだせない。また、その効果についても予想し得ない程度に顕著なものとも認められない。

理由 2　サポート要件違反

　請求項 1，2 に係る発明について、「蛋白質分解酵素による処理を施されることなく基材から剥離された」心筋様細胞シートとして発明の詳細な説明に具体的に記載されているのは、水に対する上限もしくは下限臨界溶解温度が 0〜80℃である温度応答性ポリマーで基材表面を被覆した細胞培養支持体上で培養し、その後培養液温度を上限臨界溶解温度以上もしくは下限臨界溶解温度以下として剥離したもののみであり、上記方法以外に、蛋白質分解酵素による処理を施すことなく培養基剤から心筋様細胞シートを剥離する方法が開示されていない。よって、請求項 1，2 に係る発明は発明の詳細な説明に記載されたものでない。

　これに対し、㈱セルシードは、2011 年 12 月 27 日、請求項 1 に係る心筋様細胞シートに係る発明について、請求項 3 に記載された製造方法によって製造される心筋様細胞シートに限定する補正を行った。また、請求項 5 に係る心筋様細胞シートの製造方法に係る発明について、「必要に応じ」との記載を削除し、「（２）培養された細胞シートを高分子膜に密着させ、（３）そのまま高分子膜と共に剥離する」ステップを必須の構成とした。そして、以下の主張をした。

理由 1　進歩性欠如について

　今回の補正により、補正後の請求項 1 に記載された心筋様細胞シートは、培養された細胞シートを高分子膜に密着させ、そのまま高分子膜と共に剥離する

ことによって得られるものに限定された。そのような細胞シートについての記載や示唆は文献１及び２のいずれにも見当たらない。従って、文献１及び２の記載を参酌したとしても、補正後の請求項１に係る発明に想到することは当業者にとって容易なことではない。さらに、補正後の請求項５（旧請求項３）に記載の方法は、培養された細胞シートを高分子膜に密着させて剥離することを必須の工程として含むものに限定された。そのような方法についての記載や示唆は、文献１及び２のいずれにも見当たらないので、当該文献を参酌したとしても補正後の請求項５に記載の発明に想到することは当業者にとって容易なことではない。

理由２　サポート要件について

今回の補正により、補正後の請求項１に記載された心筋様細胞シートは、水に対する上限もしくは下限臨界溶解温度が0～80℃である温度応答性ポリマーで基材表面を被覆した細胞培養支持体上で培養し、培養液温度を上限臨界溶解温度以上又は下限臨界溶解温度以下とし、培養された細胞シートを高分子膜に密着させ、そのまま高分子膜と共に剥離することによって得られるものに限定されたので、本明細書の具体的な記載に対応するものとなった。従って、補正後の請求項１については当該拒絶理由には該当しない。同様の理由により、当該請求項を引用する補正後の請求項2～4についても、当該拒絶理由には該当しない。

なお、上記の応答は、電話応対において、あらかじめ審査官の合意を得た対応であったと推測される。

（５）特許付与内容：特許第4679795号

その結果、2012年1月19日に特許査定が送達された。最終請求項は下記の12項である。

【請求項１】収縮弛緩機能、細胞間の電気的結合及び配向を保持した心筋組織の細胞からなり、培養基材より剥離された心筋様細胞シートであって、

心筋様細胞シートは、

水に対する上限もしくは下限臨界溶解温度が０～８０℃である温度応答性ポリマーで基材表面を被覆した細胞培養支持体上で培養し、

培養液温度を上限臨界溶解温度以上又は下限臨界溶解温度以下とし、

培養された細胞シートを高分子膜に密着させ、

そのまま高分子膜と共に剥離する、

ことによって得られたものであり、

高分子膜が、コラーゲンからなる膜、スパンデックスからなるメッシュ、ネット状、及びストッキネット状素材から選択される、

前記細胞シート。
【請求項２】剥離において蛋白質分解酵素による処理を施さない、請求項１記載の心筋様細胞シート。
【請求項３】温度応答性ポリマーが、ポリ（Ｎ－イソプロピルアクリルアミド）である、請求項１または２記載の心筋様細胞シート。
【請求項４】基材から剥離された心筋様細胞シートを特定方向に引き伸ばすことで特定方向に配向された請求項１～３のいずれか１項記載の心筋様細胞シート。
【請求項５】水に対する上限もしくは下限臨界溶解温度が０～８０℃である温度応答性ポリマーで基材表面を被覆した細胞培養支持体上で培養し、その後
（１）培養液温度を上限臨界溶解温度以上又は下限臨界溶解温度以下とし、
（２）培養された細胞シートを高分子膜に密着させ、
（３）そのまま高分子膜と共に剥離する
ことを含む心筋様細胞シートの製造法であって、
高分子膜が、コラーゲンからなる膜、スパンデックスからなるメッシュ、ネット状、及びストッキネット状素材から選択される、前記製造法。
【請求項６】剥離において蛋白質分解酵素による処理を施さない、請求項５記載の心筋様細胞シートの製造法。
【請求項７】温度応答性ポリマーが、ポリ（Ｎ－イソプロピルアクリルアミド）である、請求項５または６記載の心筋様細胞シートの製造法。
【請求項８】心筋様細胞シート自身に内在している血管内皮細胞による管腔を基に血管が形成した請求項１～４のいずれか１項記載の心筋様細胞シート。
【請求項９】請求項１～４及び８のいずれか１項記載の心筋様細胞シートをヒト以外の生体内に埋入することで、当該心筋様細胞シート自身に内在している血管内皮細胞による管腔形成、及び／または埋入された周囲の組織内の血管内皮細胞を進入させかつ管腔を形成させることにより血管を形成させた心筋様組織。
【請求項１０】心疾患、その他の循環器関連疾患、或いは消化器関連疾患の治療用の請求項１～４及び８のいずれか１項記載の心筋様細胞シートまたは請求項９記載の心筋様組織。
【請求項１１】心臓の収縮能の弱まった部位に移植することで心疾患を治療するために使用される、請求項１０記載の心筋様細胞シートまたは心筋様組織。
【請求項１２】請求項１～４及び８のいずれか１項記載の心筋様細胞シートまたは請求項９記載の心筋様組織を利用したヒト以外の動物における心疾患、その他の循環器関連疾患、或いは消化器関連疾患の治療法。

３－２－４　日本分割出願の詳細：特願 2010-168577
（１）出願内容
㈱セルシードは、親出願（特願 2010-016910）の拒絶査定不服審判の請求と同時に、親出願の出願当初の内容で分割出願をした。その後、2010 年 8 月 25 日付けで審査請求を行い、これと同時にの自発補正により請求の範囲について補正をした。補正後の請求項は、下記 16 項であった。
【請求項１】収縮弛緩機能を保持する心筋様細胞の３次元構造体であって、
該３次元構造体は心筋様細胞シートを重層化してなり、
該細胞シートは心筋組織の培養細胞からなり、蛋白質分解酵素による処理を施されることなく高分子膜に密着させて細胞培養支持体から剥離され、
該心筋組織の培養細胞は、３次元の細胞間の電気的結合及び配向を有する、
前記３次元構造体。
【請求項２】血管内皮細胞によって管腔が形成される請求項１に記載の３次元構造体。
【請求項３】心外膜様の細胞層を外層に有する請求項１又は２に記載の３次元構造体。
【請求項４】特定方向に引き延ばすことによって特定方向に配向された請求項１～３のいずれか１項に記載の３次元構造体。
【請求項５】高分子膜が、セルロース及びその誘導体、コラーゲン、紙からなる膜、ポリウレタン、スパンデックスからなるメッシュ、ネット状、及びストッキネット状素材から選択される、請求項１～４のいずれか１項に記載の３次元構造体。
【請求項６】該心筋組織の培養細胞をフィーダーレーヤーと共に培養することによって心筋様細胞シートを重層化してなる、請求項１～５に記載の３次元構造体。
【請求項７】水に対する上限もしくは下限臨界溶解温度が０～８０℃である温度応答性ポリマーで被覆された細胞培養支持体上で心筋組織の細胞を培養することにより心筋様細胞シートを形成させ、その後
（１）培養液温度を上限臨界溶解温度以上又は下限臨界溶解温度以下とし、
（２）心筋様細胞シートに高分子膜を密着させ、
（３）蛋白質分解酵素による処理を施さずに心筋様細胞シートを高分子膜と共に剥離し、
（４）心筋様細胞シートを重ね合わせる、
ことを含む、心筋様細胞の３次元構造体の製造法。
【請求項８】（４）が、
（ａ）（３）で高分子膜と共に剥離した心筋様細胞シートを、心筋様細胞シート

を下にして別の細胞培養支持体に付着させ、
（ｂ）培地を加えることによって高分子膜を心筋様細胞シートから剥がし、
（ｃ）（ｂ）の心筋様細胞シートに、高分子膜と共に剥離した別の心筋様細胞シート又は別の心筋様細胞の３次元構造体を付着させ、そして
（ｄ）（ｂ）及び（ｃ）を繰り返すこと；
（ｅ）（３）で高分子膜と共に剥離した心筋様細胞シートを、高分子膜を下にして別の細胞培養支持体に固定させ、
（ｆ）（ｅ）の心筋様細胞シートに、高分子膜と共に剥離した別の心筋様細胞シート又は別の心筋様細胞の３次元構造体を付着させ、
（ｇ）培地を加えることによって（ｅ）の高分子膜を心筋様細胞シートから剥がし、
（ｈ）（ｇ）の心筋様細胞シートに、高分子膜と共に剥離した別の心筋様細胞シート又は別の心筋様細胞の３次元構造体を付着させ、そして
（ｉ）（ｇ）及び（ｈ）を繰り返すこと；
（ｊ）（３）で高分子膜と共に剥離した心筋様細胞シートと、高分子膜と密着した別の心筋様細胞シート又は別の心筋様細胞の３次元構造体を、お互いの細胞側で付着させること；
のいずれか１つ又は２以上を含む、請求項５～７のいずれか１項に記載の３次元構造体の製造法。
【請求項９】温度応答性ポリマーが、ポリ（Ｎ－イソプロピルアクリルアミド）である、請求項５～８のいずれか１項に記載の３次元構造体の製造法。
【請求項１０】高分子膜が、セルロース及びその誘導体、コラーゲン、紙からなる膜、ポリウレタン、スパンデックスからなるメッシュ、ネット状、及びストッキネット状素材から選択される、請求項５～９のいずれか１項に記載の３次元構造体の製造法。
【請求項１１】請求項５～１０のいずれか１項に記載の製造法によって得られる心筋様細胞の３次元構造体。
【請求項１２】心筋様細胞の３次元構造体に内在している血管内皮細胞によって管腔が形成され、該管腔に基づいて血管が形成される、請求項１～４及び１１のいずれか１項に記載の心筋様細胞の３次元構造体。
【請求項１３】請求項１～４、及び１１のいずれか１項に記載の心筋様細胞の３次元構造体であって、
該３次元構造体をヒト以外の生体内に埋入することによって、
該３次元構造体に内在している血管内皮細胞によって管腔が形成され、及び／又は
該３次元構造体が埋入された部位の周囲の組織に由来する血管内皮細胞が該３

次元構造体に進入することによって管腔が形成され、
該管腔に基づいて血管が形成される、
前記３次元構造体。
【請求項１４】心疾患、その他の循環器関連疾患、又は消化器関連疾患の治療用の請求項１～４及び１１～１３のいずれか１項に記載の３次元構造体。
【請求項１５】心臓の収縮能の弱まった部位に移植することによって心疾患を治療するために使用される、請求項１４に記載の３次元構造体。
【請求項１６】請求項１～４及び１１～１５のいずれか１項に記載の３次元構造体を利用したヒト以外の動物における心疾患、その他の循環器関連疾患、又は消化器関連疾患の治療法。

（２）最初の拒絶理由通知、及び、これに対する出願人の応答
　2012 年 5 月 24 日に、拒絶理由通知が出された。内容は下記のものである。
理由１　分割出願違反
　本願の請求項 6「該心筋組織の培養細胞をフィーダーレーヤーと共に培養することによって心筋様細胞シートを重層化してなる、請求項１～５に記載の３次元構造体。」なる記載について、出願人は原出願である特願 2002-513872 号の明細書の【0004】を根拠として挙げている。しかしながら、【0004】には、従来技術として「３Ｔ３細胞をフィーダーレイヤーとして増殖、重層化させ、蛋白質分解酵素であるディスパーゼを用いて細胞シートを回収する技術が開示されている。」なる記載があるものの、本願発明の心筋様細胞シートをフィーダーレイヤーとして増殖、重層化させることは一切記載されておらず、また原出願明細書の記載から自明なものでもない。よって、本願の請求項６に係る発明は、本願の願書において分割の原出願と記載されている特願 2002-513872 の明細書に記載された事項にないから、この出願は適法な分割出願と認めることができない。したがって、本願は出願日の遡及が認められず、本願の出願日である 2010 年 7 月 27 日を基準として審査する。請求項 6 を引用する他の請求項についても同様である。
理由 2　新規性欠如及び進歩性欠如:請求項 1～5, 7～16
　引用文献 1（原出願, WO2002/008387）には、本願の請求項 1～5, 7～16 に係る発明が記載されている。
理由 3　サポート要件違反
(i)　請求項 1～5 に係る発明について、「蛋白質分解酵素による処理を施されることなく」細胞培養支持体から剥離された心筋様細胞シートとして発明の詳細な説明に具体的に記載されているのは、水に対する上限もしくは下限臨界溶解温度が０～８０℃である温度応答性ポリマーで基材表面を被覆した細胞培養支

持体上で培養し、その後培養液温度を上限臨界溶解温度以上もしくは下限臨界溶解温度以下として剥離したもののみであり、上記方法以外に、蛋白質分解酵素による処理を施すことなく細胞培養支持体から心筋様細胞シートを剥離する方法が開示されていない。よって、請求項1～5に係る発明は発明の詳細な説明に記載されたものでない。
（ii） 請求項6に係る発明について、発明の詳細な説明には、心筋組織の培養細胞をフィーダーレーヤーと共に培養することによって心筋様細胞シートを重層化することは何ら具体的に開示されていない。よって、請求項6に係る発明は、発明の詳細な説明に記載したものでない。

それに対し、出願人は、2012年7月23日、分割出願違反を指摘された請求項6を削除して分割出願の要件違反を解消し、出願時が遡及することにより新規性欠如及び進歩性欠如の拒絶理由を解消した。また、請求項1において、細胞シートを剥離する手段を明確に特定する補正を行うことにより、サポート要件違反を解消した。補正後の請求項1は、下記のとおりである。
「【請求項１】収縮弛緩機能を保持する心筋様細胞の３次元構造体であって、
　該３次元構造体は心筋様細胞シートを重層化してなり、
　該細胞シートは、水に対する上限もしくは下限臨界溶解温度が０～８０℃である温度応答性ポリマーで被覆された細胞培養支持体上で心筋組織の細胞を培養することにより形成され、培養液温度を上限臨界溶解温度以上又は下限臨界溶解温度以下にすることによって、蛋白質分解酵素による処理を施されることなく高分子膜に密着させて細胞培養支持体から剥離され、
　該心筋組織の細胞は、３次元の細胞間の電気的結合及び配向を有する、
　前記３次元構造体。」
その結果、2012年8月8日付で、特許査定が送達された。

３－２－５　欧州出願の詳細：01945762.1
（１）欧州移行時の手続補正の内容
2003年1月21日付の移行時に行った手続補正後の請求項は下記の13項であった。PCT出願の請求項を英訳し、更に、請求項13についてスイスタイプクレームに改める補正がなされている。
1.　A myocardium-like cultured cell sheet made of myocardial tissue cells that retain contracting and relaxing functions, intercellular electrical coupling and orientation.
2.　A three-dimensional structure of myocardium-like cultured cells that retain contracting and relaxing functions, as well as

three-dimensional intercellular electrical coupling and orientation, said structure forming tubular cavities of vascular endothelial cells and/or having a single epicardium-like outer cell layer.
3. The myocardium-like cultured cell sheet according to claim 1 or the three-dimensional structure according to claim 2, which have been peeled off from a substrate without being treated with a proteolytic enzyme.
4. The myocardium-like cultured cell sheet or three-dimensional structure according to claim 1, 2 or 3, which have been oriented in a specified direction by stretching them in the specified direction after they were peeled off from the substrate.
5. A process for producing a myocardium-like cell sheet, which comprises culturing cells on a cell culture support having a substrate surface coated with a temperature-responsive polymer whose upper or lower critical solution temperature in water is 0 to 80 °C, and subsequently:
(1) bringing the temperature of the culture solution to above the upper critical solution temperature or below the lower critical solution temperature, and optionally;
(2) bringing the cultured cell sheet into close contact with a polymer membrane; and
(3) peeling the cell sheet off together with the polymer membrane.
6. A process for producing a three-dimensional structure of myocardium-like cells, in which the myocardium-like cell sheet as obtained in claim 5 is again allowed to adhere to a cell culture support, a cell culture support coated with a temperature-responsive polymer, a polymer membrane or a cellular sheet and a plurality of the assemblies are piled up.
7. The process for producing a myocardium-like cell sheet according to claim 5 or the process for producing a three-dimensional structure of myocardium-like cells according to claim 6, wherein the step of peeling off does not involve treatment with a proteolytic enzyme.
8. The process for producing a myocardium-like cell sheet according to claim 5 or the process for producing a three-dimensional structure of myocardium-like cells according to claim 6, wherein the temperature-responsive polymer is poly (N-isopropylacrylamide).
9. The process for producing a myocardium-like cell sheet according to claim 5 or the process for producing a three-dimensional structure of

myocardium-like cells according to claim 6, wherein the polymer membrane is selected from among a hydrophilized polyvinylidene difluoride membrane, polyurethane, a Spandex mesh and a stockinet-like material.
10. A myocardium-like cell sheet or a three-dimensional structure of myocardium-like cells that are produced by the process according to any one of claims 5 to 9.
11. A myocardium-like tissue produced by a method in which the myocardium-like cell sheet or three-dimensional structure of myocardium-like cells according to any one of claims 1 to 4 and 10 is buried in the living body so that tubular cavities are formed of vascular endothelial cells endogenous in said myocardium-like cell sheet or three-dimensional structure of myocardium-like cells and/or the vascular endothelial cells in the tissue around the buried graft are allowed to grow inward and form tubular cavities, thereby forming blood vessels.
12. The myocardium-like cell sheet or three-dimensional structure of myocardium-like cells according to any one of claims 1 to 4 and 10 or the myocardium-like tissue according to claim 11, which are suitable for use in the treatment of heart disease and other circulatory organ related diseases or digestive organ related diseases.
13. Use of a myocardium-like cell sheet or three-dimensional structure of myocardium-like cells according to any one of claims 1-4 and 10 or the myocardium-like tissue according to claim 11 for the treatment of heart disease and other circulatory organ related diseases or digestive organ related diseases.

（２）拒絶理由に関する１回目の庁指令、及び、これに対する出願人の応答

2007 年 7 月 31 日に拡張サーチレポートが発行された。拡張サーチレポートでは、クレーム 1～3 が、五島の文献 D1（循環制御, 1993, 14 巻, 4 号, 495-500 頁）に対する新規性がないこと、クレーム 5, 7, 8, 10 が、本発明者の大和らの文献 D2（東京女子医科大学総合研究所紀要, 1998, 19 巻, 173-174 頁）に対する進歩性がないこと、クレーム 12 が D1 及び D2 に対する進歩性がないと判断されたが、クレーム 4, 6, 9, 11 については特許性ありと判断された。また、クレーム 13 は、ヒトを治療する方法であるため審査されなかった。出願人の㈱セルシードは、これに応ずることなく審査続行の意思表示をし、2008 年 9 月 18 日に拒絶理由に関する１回目の庁指令がなされた。その内容は下記のとおりである。

①出願人が入手できるなら、D1, D2, 本発明者の清水の文献 D4（Cardiac tissue engineeringーバイオマテリアルを用いた心筋組織の構築, 医学のあゆみ, 2000年 10 月 21 日, 195 巻, 3 号, p.203-204)、及び、本発明者の岡野らの文献 D6（特開平 5-192138 号公報）の英訳は感謝される。
②国際調査報告は 2 つの中間文献（いずれも本願発明者の清水らの文献 D3 及び D4）を引用するが、これらはクレームされた主題の特許性の査定のため非常に関係がある。それゆえ、本願の優先権書類が必要とされるので、出願人は、その翻訳の提供が要求される。
③現在の独立請求項 12 は、正しい第二医薬用途のフォーマットではないので、EPC53 条(c)に違反している。現在の記載では、クレームはヒト又は動物の治療法を規定するものである。
④現在のクレームセットは 4 つの独立項（クレーム 1, 2, 10, 11）はすべて心筋組織シート／構造に係るものである。同じカテゴリにおける４つの独立項は、EPC84 条及び EPC 規則 29 に基づき許されない。ただ 1 つの独立した物のクレームのみが許される。本件においては、明確性の観点から、クレーム 10 のようなプロダクトバイプロセスクレームが EPC 84 条の規定においては最も適切である。クレーム 1, 2 は、シートや構造の望ましい機能の特性の観点で物を定義し、それを解決するいかなる技術的手段も特定していないため、不明確である。クレーム 11 は、少なくとも部分的に意図される使用を通じて物を特定するので、不明確である。本発明の明細書は、本発明の方法及び物に適用されるものは、生体内の心臓から得られた細胞であれば特に限定されるものではなく、その中には心筋細胞、血管内皮細胞、及び繊維芽細胞等が含まれていることが教示されている。現在の独立クレーム 5 の製法クレームは、細胞が用いられることが特定されていないので、明確性及び不可欠な特徴を欠く（EPC84 条）。
⑤本発明者の菊池らの文献D5（J Biomater.Sci.Polymer Edn. 1998, Vol.9, No.12, p.1331-1348）は、PIPAAmでコートされた支持体上で血管内皮細胞培養することを教示するので、独立クレーム5の方法のスコープを内包する方法を教示する。現在の培養された細胞シートを高分子膜に密着させるステップは、選択的であり、それゆえ、クレームにはD5に対する新規性を授与できない（EPC52条(2)）。このステップが必須でなさるのだとしても、D5はクレームに用いられる同じ目的のため高分子膜を採用することを教示するから、クレームはまだD5に対する新規性を欠く。D5はキチン膜又はPET膜を用いることを教示する（EPC52条(2)）。この新規性拒絶はプロダクトバイプロセスクレームであるクレーム10にも適用する。
⑥米国ジェンザイム社の文献 D8（WO99/66036)、及び、Smith らの文献 D9（US5543318）は心筋様シート又は心筋様構造及びそれらの医療用途を教示する。

つまり、本発明のクレーム1, 2, 12が記載されている(EPC54(2))。
⑦さらに、クレーム1～12に含まれる新規な主題は、本発明者の菊池らの文献D5の観点で、進歩性を有しない(EPC56条)。D5は、血管内皮細胞を採取するとき「高分子膜」としてキチン膜又はPET膜を用いることを教示する。D5と、本発明のプロセスのスコープに含まれる新規な主題との違いは、本発明において心筋細胞又は繊維芽細胞のような異なる細胞が用いられること、及び、異なるタイプの高分子膜が用いられ得るのみである。しかしながら、当業者がD5のプロセスに本発明の種類の細胞を用いないこと、及び、キチン又はPETと同様な膜を使用しないという理由は存在しない。したがって、本発明のプロセスクレーム、及び、それによって得られるシート（クレーム9）は進歩性を有しない。

これに対し、㈱セルシードは、通常の応答期限4ヶ月から2ヶ月の延長を2度請求した後、2009年5月27日、補正書及び意見書を提出した。この補正により、もとのクレーム4～10, 12, 13が残された。すなわち、３次元構造体の製造法（クレーム1～4)、その３次元構造体（クレーム2, 5, 6)、その３次元構造体の製造のための心筋細胞等の使用(クレーム7, 8)に係る発明に限定され、心筋様細胞シート及びその製造法にかかる発明については削除された。そして、㈱セルシードは、意見書で以下の主張をした。
①審査官の要求に応えて、D1, D2, D4及びD6の英訳を提出した。
②本願の優先権書類を提出し、優先日前に公開されたD3, 4を引例から回避した。
③補正後のクレーム7, 8は、正しい第二医薬用途のフォーマットである。
④物クレームのカテゴリは、製法による物のカテゴリ（補正前のクレーム10）のみとなり、補正前のクレーム1, 2, 11は削除した。また、細胞は、３次元構造体の製造法（補正前のクレーム5）で使用される細胞は、心筋細胞、血管内皮細胞、及び繊維芽細胞等に限定した。したがって、EPC84条に規定する要件を満たす
⑤新規性欠如については、拒絶理由を指摘されたクレームを削除することで解消した。
⑥進歩性なしの理由については以下の通り反論する。
本発明者の菊池らの文献D5は融合的に培養された血管内皮細胞の２次元の操作のみを開示する。D5は補正後のクレームされた心筋様細胞の３次元構造を製造するプロセス、及び、それに得られた心筋様細胞の３次元構造を開示も示唆もしない。したがって、補正後のクレームはD5に対する進歩性を有する。

（３）拒絶理由に関する２回目の庁指令、及び、これに対する出願人の応答

2009年9月10日、新たな拒絶理由が通知された。
①明確性（EPC84条）
・「水に対する上限もしくは下限臨界溶解温度が0～80℃である」なる記載のうち「下限臨界溶解温度」及び「上限臨界溶解温度」なる定義が不明確である。これらの表現は混合物の意味をなすものであり、これらの表現が一の高分子に関してどのように理解されるべきか明確でない。また、「0～80℃」が言及するものも明確でない。いかなる温度も「0～80」ということか、あるいは、下限臨界溶解温度が0℃であり、上限臨界溶解温度が80℃であるということか？
・「培養された細胞シートを高分子膜又はメッシュに密着させ、」の記載は「密着（close contact）」が明確でない。”direct contact”か何かを意味するものか”close”がどのようにcloseかが明確でない。
・「得られた心筋様細胞シートを通常の細胞培養支持体又は温度応答性ポリマーで表面を被覆した細胞培養支持体に付着させ、必要に応じてこの工程を繰り返す」（allowing the thus obtained myocardium-like sheet to adhere to another cell sheet on a normal cell culture support or a cell culture support coated with a temperature-responsive polymer and repeating this process as appropriate…）がいくつかの理由で明確でない。
付着すべき表面がほか他方の表面に直接接触されるべきか、心筋様細胞シートの各々と向き合うべきか明確でない。
“another cell sheet”は、異なる細胞シートが本発明の方法で得られる心筋様細胞シートであるか、あるいは、いかなる細胞シートであってもよいのかが不明確であるから、明確でない。
“ a normal cell culture support”は、”normal”が何を意味し、どのような技術的特徴がそのような支持体の特徴であるのかが明確でないから、明確でない。
“…to adhere to another cell sheet on a normal cell culture support or a cell culture support coated with a temperature- repponsive polymer..”が”on”が意味するものが明確でないから、明確でない。”　“…to adhere to another cell sheet **which is present** on a normal cell”ということか？　“or a cell culture support…”は、”or”が意味するものが明確でないから、明確でない。異なる培養支持体を意味するのか、あるいは、”thus obtained myocaridium-like sheet”が温度応答性ポリマーで被覆された細胞培養支持体に付着できるのか?
「温度応答性」ポリマーが明確でない。いかなるポリマーも少なくともある程度は「温度応答性」である。
最後に、「必要に応じてこのプロセスを繰り返す」は、「このプロセス」が何

であるのか明確でないから明確でない。
・クレーム２は「クレーム１に記載された３次元構造体」であるが、クレーム１はそのような構造をクレームしないので、明確でない。
②新規性欠如（EPC54 条(2)）
　本発明者の菊池らの文献 D5 は少なくとも独立クレーム１，５，７，８に記載された主題を開示する。D5 は二次元単一層の細胞シートを積層することによって得られる３次元組織構造を明示する。
③進歩性欠如（EPC56 条）
　全てのクレームは先行技術に対する進歩性がない。本発明のタイプを含むさまざまな種類の細胞の培養されたシートが、現在の好ましい PIPAAm 表面を用いることによって得られることは D5 などの先行技術で知られている単層のシートを積層することによって３次元構造を生成することは予測される。

　これに対し、2010 年１月 20 日に出願人は以下のように応答した。
① 補正について
・補正後のクレーム１は、生体内の心臓から得られる細胞が、心筋様細胞シートを作製するために培養されることに限定した。また、本発明のプロセスの最初の部分によって得られる心筋細胞様シートが付着される細胞シートは、異なる心筋様細胞シートに付着されることに特定された。また、他方の心筋様細胞シートは、温度応答ポリマーに被覆されていない細胞培養支持体又は上限もしくは下限臨界溶解温度が 0～80℃である温度応答性ポリマーで基材表面を被覆した細胞培養支持体に付着されることに限定した。
・クレーム２は、三次元細胞培養支持体の製造するプロセスに補正した。
②明確性（EPC84 条）
・「上限もしくは下限臨界溶解温度」及び「0～80℃」について
　「上限もしくは下限臨界溶解温度」は、本発明者の岡野らの文献 D6 に詳細に記載されており、当業者はこれが意味することを理解できる。「0～80℃」については、「上限臨界溶解温度」及び「下限臨界溶解温度」の技術的意味が、水中でポリマーの溶解性が変化する特定の温度であると理解できる当業者であれば、この表現が、選択されるポリマーの特定の「上限臨界溶解温度」又は「下限臨界溶解温度」が本発明に役に立つためにあるべき温度範囲を意味すると明確に理解する。
・”close”について
　”close”は相対的な文言であるが、本発明のクレームの全体からは明確である。本発明のステップ(3)において、培養細胞シートが高分子膜又はメッシュとともに剥がされることが要求されることを考慮すれば、”close”の意味は細胞

シートと、高分子膜又はメッシュとのある種の物理的相互作用があり、それをはがせることが可能である態様でなければならないから、その機能は特定される。

・”Surface Cotact”について

審査官の指摘は、2つの心筋様細胞を付着する代替し得る特定の方法が得られることを含むことを指摘するものであるが、クレームの下に種々な代替し得る態様があることは不明確であるとはいえない。

・”this process”について

クレームされたプロセスの物は心筋様細胞の三次元構造が、一の心筋様細胞シートを他のの2以上の細胞シートを積層して付着することによってステップ(4)において作製されるものである。2以上の細胞シートからなる３次元構造を得るために、多層の３次元構造を作製するため心筋様細胞の付着が繰り返さなければならない。当業者はそれゆえクレームにおいて”this process”が使用されると理解できる。

・”another cell sheet”，“normal”，“on”，「温度応答ポリマー」，クレーム2について

補正により解消された。

② 新規性欠如（EPC54条(2)），進歩性欠如（EPC56条）

補正後のクレーム1は、生体の心臓から得られる培養を培養することを含む心筋様細胞の三次元構造を製造する方法に限定した。心筋様細胞とは、収縮弛緩機能、細胞間の電気的結合及び配向を保持していることが明細書において定義されており、実施例においても示されている。しかしながら、これらの機能を保持する三次元構造体はいずれの引用文献にも記載されていない。

本発明者の清水らの文献D5は細胞付着表面としてコラーゲン層を有する血管内皮細胞の単層を開示するのみであり、そのような層は収縮弛緩機能、細胞間の電気的結合及び配向を保持していない。D5の三次元組織については、血管内皮細胞のみが柱状空洞を形成してもよいだけであり、これらの細胞のみが収縮弛緩機能、細胞間の電気的結合及び配向を保持できることではない。それゆえ、D5は、クレーム1に係る心筋様細胞の３次元構造を製造する工程を開示しない。また、クレームで記述された細胞培養支持体で心筋様細胞を培養し、クレームされた心筋様細胞の三次元構造を製造するプロセスを導く教示あるいは示唆はD5にはない。

（４）拒絶理由に関する３回目の庁指令、及び、これに対する出願人の応答

これに対し、2010年2月9日に審査官により書面により通知がなされた。この書面において、”obtainable from the living heart”が”which have been

obtained from the living heart"に置き換えること、及び、意見書において D5の差異と主張する「収縮弛緩機能、細胞間の電気的結合及び配向を保持する心筋様細胞の三次元細胞構造体」であることを特定すれば、出願人の補正及び反論は受け入れられる旨が示された。

これに対し、出願人は2010年5月20日、審査官の指摘に応じる応答をし、その結果、2010年7月10日特許付与すべき通知がなされ、2010年12月23日特許査定がなされた。その後、特許異議が申し立てることなく特許異議期間が終了している。最終請求項は下記の9項である。

1. A process for producing a three-dimensional structure of myocardium-like cells having contracting and relaxing functions, intercellular electrical coupling and orientation, which comprises culturing cells which have been obtained from the living heart on a cell culture support having a substrate surface coated with a temperature-responsive polymer whose upper or lower critical solution temperature in water is 0-80 ℃, and subsequently:
(1) bringing the temperature of the culture solution to above the upper critical solution temperature or below the lower critical solution temperature;
(2) bringing the cultured cell sheet into close contact with a polymer membrane or mesh;
(3) peeling the cell sheet off together with the polymer membrane or mesh without using a protelystic enzyme to obtain a myocardium-like cell sheet, and
(4) producing a three-dimensional structural of myocardium-like cell sheet by allowing the thus obtained myocardium-like cell sheet to adhere to another myocardium-like cell sheet, which is adhered to a cell culture support not coated with a temperature-responsive polymer or to a cell culture support coated with a temperature-responsive polymer or to a cell culture support coated with a temperature-responsive polymer whose upper or lower critical solution temperature in water is 0-80 ℃., and repeating this process as appropriate, thus piling up two or more cell sheets.
2. The process for producing a three-dimensional structure according to claim 1, wherein the three-dimensional structure has been oriented in a specified direction by stretching them in the specified direction after it was peeled off from the substrate.
3. The process for producing a three-dimensional structure of myocardium-like cells according to claim 1, wherein the

temperature-responsive polymer is poly(N-isopropylacrylamide).
4 The process for producing a three-dimensional structure of myocardium-like cells according to claim 1, wherein the polymer membrane is selected from among a hydrophilized polyvinylidene difluoride membrane, polyurethane, a Spandex mesh and a stockinet-like material.
5. A three-dimensional structure of myocardium-like cells having contracting and relaxing functions, intercellular electrical coupling and orientation that is produced by the process according to any one of claims 1-4.
6. The three-dimensional structure of myocardium-like cells according to claim 5, which is a three-dimensional structure of myocardium-like cells in which tubular cavities are formed of vascular endothelial cells endogenous in said three-dimensional structure of myocardium-like cell and the vascular endothelial cells in the tissue around the buried graft are allowed to group inward and form tubular cavities, thereby forming blood vessels.
7. The three-dimensional structure of myocardium-like cells according to claim 5, which is suitable for use in the treatment of heart disease and other circulatory organ related diseases or digestive organ related diseases.
8. Use of cells which have been obtained from the living heart for the manufacture of three-dimensional structure of myocardium-like cells according to any one of claim 5, 6 and 7 for use in the treatment of heart disease and other circulatory organ related diseases or digestive organ related diseases.
9. The three-dimensional structure of myocardium-like cells according to claim 5 for us in a method of treating heart disease and other circulatory organ related diseases or digestive organ related diseases.

３－２－６　欧州分割出願の詳細：10181984.5

（１）出願時の内容

　親出願（欧州出願 01945762.1）の特許付与すべき通知後、㈱セルシードは、2010 年 9 月 29 日に親出願の欧州移行時と同一の請求項で分割出願をした。

（２）拒絶理由に関する１回目の庁指令、及び、これに対する出願人の応答

　2010 年 5 月 11 日付の庁指令にて親出願の欧州移行時と同一の請求項である旨

が指摘され、2011年7月19日付で下記のとおり、心筋様培養細胞シート及びその製造法に係る7項の請求項に補正がなされた。

1. A myocardium-like cultured cell sheet made of myocardial tissue cells that retain contracting and relaxing functions, intercellular electrical coupling and orientation,
 wherein the cell sheet is obtainable by peeling off from a cell culture support having a substrate surface coated with a temperature-responsive polymer whose upper or lower critical solution temperature in water is 0-80 degrees C without being treated with a proteolytic enzyme, and
 wherein the cell have been obtained from a heart.

2. The myocardium-like cultured cell sheet according to claim 1, which can obtain orientation in a specified direction by being stretched in the specified direction after being peeled off from the substrate.

3. A process for producing a myocardium-like cell sheet, which comprises culturing cells which have been obtained from a heart on a cell culture support having a substrate surface coated with a temperature-responsive polymer whose upper or lower critical solution temperature in water is 0 SIMILAR 80 DEG C, and subsequently:
(1) bringing the temperature of the culture solution to above the upper critical solution temperature or below the lower critical solution temperature;
(2) peeling the cell sheet off from the culture support,
 wherein the cell sheet peeled off fro, the culture support shringks and has no contamination by a third substance.

4. The process for producing a myocardium-like cell sheet according to claim 3, wherein the step of peeling off does not involve treatment with a proteolytic enzyme.

5. The process for producing a myocardium-like cell sheet according to claim 3, wherein the temperature-responsive polymer is poly(N-isopropylacrylamide).

6. The process for producing a myocardium-like cell sheet according to claim 3, wherein the cell sheet is peeled off from the culture support together with a polymer membrane selected from the group consisting of a hydrophilized polyvinylidene difluoride membrane, polyurethane, a Spandex mesh and a stockinet-like material.

7. The myocardium-like cell sheet according to claim 1 or 2 for use in a

method of treatment of heart disease and other circulatory organ related diseases or digestive organ related diseases.

その結果、2011 年 12 月 7 日に特許付与すべき通知がなされ、その後、2012 年 5 月 10 日に特許査定がなされた。

３－２－７　米国出願の詳細：10/333473

（１）米国移行時の手続補正の内容

米国移行時に行われた 2003 年 7 月 15 日付の手続補正における請求項は下記の 13 項であった。国際出願の請求項を英訳し、さらに請求項 4, 7～13 について従属関係を改める補正がなされている。

1. A myocardium-like cultured cell sheet made of myocardial tissue cells that retain contracting and relaxing functions, intercellular electrical coupling and orientation.
2. A three-dimensional structure of myocardium-like cultured cells that retain contracting and relaxing functions, as well as three-dimensional intercellular electrical coupling and orientation, said structure forming tubular cavities of vascular endothelial cells and/or having a single epicardium-like outer cell layer.
3. The myocardium-like cultured cell sheet according to claim 1 or the three-dimensional structure according to claim 2, which have been peeled off from a substrate without being treated with a proteolytic enzyme.
4. The myocardium-like cultured cell sheet or three-dimensional structure according to claim 1 , which have been oriented in a specified direction by stretching them in the specified direction after they were peeled off from the substrate.
5. A process for producing a myocardium-like cell sheet, which comprises culturing cells on a cell culture support having a substrate surface coated with a temperature-responsive polymer whose upper or lower critical solution temperature in water is 0 to 80 ℃, and subsequently:
(1) bringing the temperature of the culture solution to above the upper critical solution temperature or below the lower critical solution temperature, and optionally;
(2) bringing the cultured cell sheet into close contact with a polymer membrane; and
(3) peeling the cell sheet off together with the polymer membrane.
6. A process for producing a three-dimensional structure of

myocardium-like cells, in which the myocardium-like cell sheet as obtained in claim 5 is again allowed to adhere to a cell culture support, a cell culture support coated with a temperature-responsive polymer, a polymer membrane or a cellular sheet and a plurality of the assemblies are piled up.

7. The process for producing a myocardium-like cell sheet according to claim 5 or the process for producing a three-dimensional structure of myocardium-like cells, in which the myocardium-like cell sheet as obtained in claim 5 is again allowed to adhere to a cell culture support coated with a temperature-responsive polymer, a polymer membrane or a cellular sheet and a plurality of the assemblies are piled up, wherein the step of peeling off does not involve treatment with a proteolytic enzyme.

8. The process for producing a myocardium-like cell sheet according to a process for producing a three-dimensional structure of myocardium-like cells, in which the myocardium-like cell sheet as obtained in claim 5 is again allowed to adhere to a cell culture support, a cell culture support coated with a temperature-responsive polymer, a polymer membrane or a cellular sheet and a plurality of the assemblies are piled up, wherein the temperature-responsive polymer is poly(N-isopropylacrylamide).

9. The process for producing a myocardium-like cell sheet according to claim 5 or the process for producing a three-dimensional structure of myocardium-like cells according to a process for producing a three-dimensional structure of myocardium-like cells, in which the myocardium-like cell sheet as obtained in claim 5 is again allowed to adhere to a cell culture support, a cell culture support coated with a temperature-responsive polymer, a polymer membrane or a cellular sheet and a plurality of the assemblies are piled up, wherein the polymer membrane is selected from among a hydrophilized polyvinylidene difluoride membrane, polyurethane, a Spandex mesh and a stockinet-like material.

10. A myocardium-like cell sheet or a three-dimensional structure of myocardium-like cells that are produced by the process according to claim 5.

11. A myocardium-like tissue produced by a method in which the myocardium-like cell sheet or three-dimensional structure of myocardium-like cells according to claim 1 is buried in the living body

so that tubular cavities are formed of vascular endothelial cells endogenous in said myocardium-like cell sheet or three-dimensional structure of myocardium-like cells and/or the vascular endothelial cells in the tissue around the buried graft are allowed to grow inward and form tubular cavities, thereby forming blood vessels.

12. The myocardium-like cell sheet or three-dimensional structure of myocardium-like cells according to claim 1, which are suitable for use in the treatment of heart disease and other circulatory organ related diseases or digestive organ related diseases.

13. A method of treating heart disease and other circulatory organ related diseases or digestive organ related diseases using the myocardium-like cell sheet or three-dimensional structure of myocardium-like cells according to claim 1.

（２）最初のオフィスアクション、及び、これに対する出願人の応答

2006 年 2 月 15 日付で最初のオフィスアクションが発行された。このオフィスアクションでは、以下の拒絶理由が指摘されている。

①クレーム 12, 13 は記述要件（112 条第 1 パラグラフ）を満たさない。
②クレーム 1～13 は明確でない（112 条第 2 パラグラフ違反)。
③クレーム 1, 12 は Eppenberger ら（FASEB, vol. 13. Supplement, 1999, p.S83-89）又は Oyamada ら（Exp.Cell Res, 1994, p.351-357）からの新規性がない（102 条(b))。
④クレーム 2 は Akins ら（Tissue Engineering, 1999, vol. 5, p. 103-115）からの新規性がない。
⑤クレーム 1-10, 12, 13 は本発明者の Shimizu（Cardiac tissue engineering －バイオマテリアルを用いた心筋組織の構築, 医学のあゆみ, 2000 年 10 月 21 日, 195 巻, 3 号, p.203-204）からの新規性がない（102 条(a))。
⑥クレーム 1-10, 12, 13 は、本発明者の Kikuchi ら（J Biomater.Sci.Polymer Edn, 1998, vol.9, No.12, p.1331-1348)と、Hirose ら(Biomecromolecules, vol.1, 2000, p.377-381)、Eppenberger ら、及び、Akins らとの組み合わせから自明である（103 条)。
⑦クレーム 1-10, 12, 13 は、Shimizu, Kikuchi らと、Hirose ら、及び、Eppenberger らとの組み合わせから自明である（103 条)。
⑧クレーム 1-11 は、Soejima ら（Plastic and Reconstructive Surgery, 1998、p.1552-1560)、及び、Li ら（Circulation Research, vol.78, 1996, p.283-288）と、Kikuchi らの文献、Hirose ら、Eppenberger ら、及び、Akins らとの組み合

わせから自明である（103 条）。
⑨クレーム 1-11 は、Soejima ら、及び、Li らと、Shimizu、Kikuchi ら、及び、Hirose らとの組み合わせから自明である（103 条）。

これに対し、2006 年 8 月 16 日付で意見書及び補正書が提出され、以下の内容で応答がなされた。
①112 条第 1 パラグラフに基づく拒絶理由について
クレーム 12 の「心疾患、その他の循環器関連疾患、或いは消化器関連疾患の治療用」及びクレーム 13 の「心疾患、その他の循環器関連疾患、或いは消化器関連疾患の治療法」のうち「消化器関連疾患」は、補正により削除した。
③ 112 条第 2 パラグラフに基づく拒絶理由について
“myocardium-like”及び”stockinet-like”の用語は、明細書中の定義に基づき当業者において明確である。
③102 条(b)に基づく拒絶理由について
補正により、本発明のシート及び三次元構造体が「培養基板から剥がされたもの」であることに特定した。Eppenberger ら、及び、Akin らは培養基板に付着している心筋細胞の機能を開示するのであり、培養基板から剥がされた本発明の心筋様培養細胞シートとは異なる。
また、Oyamada らは、培養基板から剥がされた心筋様培養細胞シートが細胞間の電気的結合及び配向することを開示しない。
また、Shimizu は、本願の優先日後に発行された文献であるので、引例適格性を有しない。
④ 103 条に基づく拒絶理由について
実施例 1 に示された以下の効果は、引例から予測できない顕著な効果である。
「（１）メッシュ上の心筋細胞シート及びその３次元構造体は、培養皿表面に固定されている時と比べ、より大きな収縮弛緩を示す。これは、個々の細胞が培養皿から脱着し自由度が増大したためと考えられる。
（２）心筋細胞シートの重層化による３次元培養を行ったところ、組織切片上２枚のシート接着が認められた。また、重層化心筋細胞シート全体が同期して拍動し、２枚のシートの電気的な結合が示唆された。さらに、心筋細胞シート全体をメッシュ上で、ある一方向にのみ収縮させると、それと垂直方向に３次元的な束状になり、その結果、心筋細胞が配向性を獲得し、長軸方向に拍動した。
（３）長期（５日間）に培養しておくと、横断組織切片上、束状の心筋細胞の周囲に、心外膜様の一層の細胞層の形成が観察された。」
また、本発明の血管新生は、血管内皮細胞の生成によって生じるものだけで

なく、「生体内に埋入された細胞シート或いは３次元構造体が、生体組織に生着すると同時に、収縮弛緩することで低酸素状態となり、それを補うために生体組織側より積極的に血管内皮細胞が進入し、血管が形成され、血液を介して酸素のみならず栄養分も十分に補給される」

したがって、本発明は、Soejimaら、Liら、Kikuchiら、Hiroseら、Eppenbergerら、及び、Akinsらの組み合わせに対する特許性を有する。

（３）ファイナルオフィスアクション、及び、これに対する出願人の応答

2006年11月15日付でファイナルオフィスアクションが発行された。このオフィスアクションでは、クレーム1-10, 12, 13は先のShimizuに対する新規性がない（102条(a)）との拒絶理由が維持され、また、すべての自明性の拒絶理由が維持された。

これに対し、2007年7月15日付で意見書及び手続補正書が提出された。意見書では、優先権証明書を提出することで、先のShimizuに基づく拒絶理由が解消した旨が主張された。また、補正により「心筋組織の細胞」が、「心筋組織由来の心筋細胞及び／又は繊維芽細胞であり、選択的に血管内皮細胞を含む」ことに特定された。

その結果、審査官は、この補正はnew issueを含むと判断し、2007年10月3日付でアドバイザリアクションが発行された。

これに対し、2007年10月15日付で、2007年7月15日付の補正書とともにRCEの手続がなされた。

（４）2回目のノンファイナルオフィスアクション、及び、これに対する出願人の応答

2008年1月9日付でノンファイナルオフィスアクションが発行された。このオフィスアクションでは、以下①～③の拒絶理由が新たに指摘された。

①クレーム11は、生体内に埋め込まれた心筋様細胞シート又は三次元構造体をクレームするものであり、人が生み出したものではなく、人体そのものにほかならない（101条違反）

②クレーム1～13は記述要件（112条第1パラグラフ）を満たさない。

③クレーム1,3は、Bergら（American Journal of pathology, 1984, vol. 114, p.187-200）から新規性がない（102条(b)）。

また、以下④、⑤は、維持された拒絶理由である。

④クレーム 1-10,12,13 は､先の Kikuchi らと､先の Hirose ら,先の Eppenberger ら、および、先の Akins らとの組み合わせから自明である（103 条)。
⑤クレーム 1-11 は、先の Soejima ら、及び、先の Li らと、先の Kikuchi ら、先の Hirose ら、先の Eppenberger ら、及び、先の Akins らとの組み合わせから自明である（103 条)。

これに対し、2008 年 7 月 9 日付で意見書及び補正書がされた。また、2008 年 7 月 12 日付で追加の意見書及び補正書が提出された。これらの応答内容は、概ね以下のとおりである。
①クレーム 10～12 は削除した。これにより、101 条に基づく拒絶理由は解消した。
②補正により､｢心筋組織の細胞｣が､｢（ａ）心筋細胞、又は､（ｂ）心筋細胞、心筋細胞由来の繊維芽細胞及び血管内皮細胞である」ことに限定した。これにより、クレーム 1～13 は、記述要件は満たすようになり、また、Berg らに対する新規性欠如は解消した。
③自明性拒絶に対しては、最初のオフィスアクションで行った反論と大凡同じ反論が行われた。

（５）3 回目のノンファイナルオフィスアクション、及び、これに対する出願人の応答

2008 年 10 月 15 日、ノンファイナルオフィスアクションが発行された。以下①，②の拒絶理由が新たに指摘された。また、自明性拒絶は前回の指摘が維持された。
①クレーム 1～9，13 は記述要件（112 条第１パラグラフ）を満たさない。
②クレーム 5～9 について自明型二重特許

これに対し、2009 年 4 月 15 日付補正書及び意見書、ならびに、同月 16 日の追加意見書により出願人は以下のように応答した。
①補正により、心筋様細胞シートに係るクレーム１が削除され、以下のクレーム２の三次元構造体に係る発明に限定された。
「血管内皮細胞による管腔形成及び／又は心外膜様の一層の細胞層を外層に有しており、収縮弛緩機能を保持し、３次元に細胞間の電気的結合及び配向を保持した心筋様培養細胞の三次元構造体であって、該構造体は培養基板から剥がされたものであり、心筋細胞、心筋組織由来の繊維芽細胞及び血管内皮細胞である心筋様培養細胞シートの構造がお互いに固定して積層されたものであり、２つのシート環で電気的接合を形成している三次元構造体。」

また、クレーム5の心筋様細胞シートの製造法は、以下のクレーム6の３次元構造体の製造法に係る発明に限定された。

「水に対する上限もしくは下限臨界溶解温度が0～80℃である温度応答性ポリマーで基材表面を被覆した細胞培養支持体上で培養し、その後

（１）培養液温度を上限臨界溶解温度以上又は下限臨界溶解温度以下とし、さらに必要に応じ

（２）培養された細胞シートを高分子膜に密着させ、

（３）そのまま高分子膜と共に剥離し、

得られた心筋様細胞シートを再び細胞培養支持体、温度応答性ポリマーで表面を被覆した細胞培養支持体、高分子膜、或いは細胞シートに付着させ、重ね合わせていくことを含む心筋様細胞の３次元構造体の製造法。」

クレーム3､4はクレームに従属する３次元構造体であり、クレーム7～9は、クレーム6に従属する３次元構造体の製造法である。

また、クレーム13の心筋様組織は削除された。

したがって、記述要件違反の拒絶理由は解消した。

また、本発明は、引例から得られない優れた効果を奏するため、引例から自明なものではない。

（６）2回目のファイナルオフィスアクション、及び、これに対する出願人の応答

2009月8月20日付ファイナルオフィスアクションが発行され、自明性拒絶、及び、自明型二重特許が維持された。

これに対し、2010月2月22日付でアピールが請求された後（応答期限の延長をねらったものと予想される。)、2010年9月22日にクレーム補正を行って、2回目のRCEの手続がなされた。このとき、３次元構造体の製造法に係るクレーム14～16、及び、３次元構造体に係るクレーム17、３次元構造体を用いた心臓病の治療法に係るクレーム18が追加された。

（７）その後～現在

2010年12月23日付で4回目のノンファイナルオフィスアクションが発行され、その後応答がなされるものの拒絶理由は解消せずに2011年9月9日付で3回目のファイナルオフィスアクションがなされた。このファイナルオフィスアクションでは、自明性及び自明型二重特許の拒絶理由が維持された。

そして、2012年3月8日付でアピールが請求された後（応答期限の延長を図るためのものと予想される。)、2012年10月5日付で、クレーム補正とともに,3回目のRCEの手続がなされた。現在係属中のクレームは以下のとおりである。

1. to 5. (Canceled)
6. (Previously Presented) A process for producing a three-dimensional structure of myocardium-like cells, in which a myocardium-like cell sheet is produced by the steps of culturing said cells on
a cell culture support having a substrate surface coated with a temperature-responsive polymer whose lower critical solution temperature in water is 0 to 80 ℃, and subsequently:
(1) bringing the temperature of the culture solution to below the lower critical solution temperature, and optionally;
(2) bringing the cultured cell sheet into close contact with a polymer membrane,
wherein the polymer membrane is selected from the group consisting of cellulose and its derivative, collagen, Japanese paper, polyurethane, Spandex mesh, net-like material, and stockinet-like material; and
(3) peeling the cell sheet off together with the polymer membrane without being treated with proteolytic enzyme, and then
(4) the myocardium-like cell sheet thus obtained is allowed to adhere to another myocardium-like cell sheet or a three-dimensional structure of myocardium-like cells.
7. (Canceled)
8. (Previously Presented) The process for producing a three-dimensional structure of myocardium-like cells according to claim 6, in which the myocardium-like cell sheet is again allowed to adhere to a cell culture support, a cell culture support coated with a temperature-responsive polymer, a polymer membrane or a cellular sheet and a plurality of the assemblies are piled up,
wherein the temperature-responsive polymer is poly(N-isopropylacrylamide).
9. to 13. (Canceled)
14. (Previously Presented) The process according to Claim 6, wherein (4) comprises:
(a) the myocardium-like cell sheet in intimate contact with the polymer membrane of (3) is allowed to adhere to another ell cut rue support such that the cell sheet contacts to the Celle culture support,
(b) a medium is added to peel off the polymer membrane from the cell she

t,
(c) another myocardium-like cell sheet or a three-dimensional structure of myocardium-like cells in intimate contact with an another polymer membrane is allowed to adhere to the cell sheet of (b), to form a three-dimensional structure of myocardium like cells and
wherein the process further comprises:
(d) repeating (b) and (c).
15. (Currently Amended) The process according to Claim 6, wherein (4) comprises:
(e) the myocardium-like cell sheet in intimate contact with the polymer membrane of (3) is turned over and fixed on the cell culture support such that the polymer membrane contacts the cell culture support,
(f) another myocardium-like sheet or a three-dimensional structure of myocardium-like cells which is peeled off together with another polymer membrane is allowed to adhere to adhere to the cell sheet of (e), to form a three-dimensional structure of myocardium-like cells,
(g) a medium is added to peel off the another polymer membrane from the another cell sheet or the three-dimensional structure of (f),
(h) another cell sheet or a three-dimensional structure of myocardium-like cells in intimate contact with another polymer membrane is allowed to adhere to the cell sheet or the three-dimensional structure of (g), and
wherein the process further comprises:
(i) repeating (g) and (h).
16. (Previously Presented) The process according to Claim 6, wherein (4) comprises:
(j) the myocardium-like cell sheet in intimate contact with the polymer membrane of (3) is turned over, and
(k) another myocardium-like sheet or a three-dimensional structure of myocardium-like cells which is peeled off together with another polymer membrane is allowed to adhere to the cell sheet of (k), to form a three-dimensional structure of myocardium-like cells .
17. (Previously Presented) A three-dimensional structure obtained by the process according to claim 6, wherein the three-dimensional structure has tubular cavities formed by vascular endothelial cells and/or a single epicardium-like outer cell layer.
18. (Previously Presented) A method of treating heart disease

comprising:
 grafting the three-dimensional structure obtained by the process according to claim 6 to the site of weakened contractile force in a heart of a subject,
wherein the heart disease is myocardial infarction.
19. (Withdrawn-Currently Amended) A method according to claim 18 comprising:
 grafting the three-dimensional structure obtained by the process according to claim 6 to the surrounding of blood vessels in a subject, thereby occurring regenesis of blood vessels in the grafted part.

３－２－８　考察

（１）日米欧の審査の比較

日本及び欧州の特許成立クレームは、いずれも、心筋様細胞シート、三次元構造体、及びこれらの製造法のカテゴリである点で共通する。また、日本及び欧州の審査のいずれにおいても、国際調査報告で引かれた五島の文献（循環制御, 1993, 14 巻, 4 号, 495-500 頁)、及び、本発明者の大和らの文献（東京女子医科大学総合研究所紀要, 1998, 19 巻, 173-174 頁）が引用された。これに対し、日本及び欧州のいずれの出願においても、高分子膜から剥離されるステップ、及び、このステップにより得られた物であることが特定されて差別化が図られたが、日本においては、更に、培養温度, 及び、高分子膜の種類が限定されているのに対し、欧州特許においては、「蛋白質分解酵素による処理を施さない」との限定で特許されている点で、日欧における違いが見られた。

一方、米国は日欧の審査とは大きく異なる経過をたどり、未だに特許付与されていない。その理由の一つとして、日本及び欧州とは異なる引例を根拠に先行技術に対する特許性が否定されていることが挙げられる。また、オフィスアクションごとに、応答期限を延長しており、また、3 度にわたるファイナルオフィスアクションの発行後～RCE の手続には、アピールを請求することによって、ほぼ 1 年をかけている。こうした出願人側の対応の遅れも審査の遅れの要因の一つになっていると思われる。

（２）新規性喪失の例外の適用について

日本においては、優先日前の発明者らの発表に対し、新規性喪失の例外の適用を受ける手続がとられている。欧州では、制度上、当該発表に対する新規性喪失の例外の適用を受けられないが、審査経過において当該発表が拒絶理由を構成する証拠として挙げられていない。そのため、当該発表により欧州特許に

無効理由が存在しないか否かの懸念が残る。
　なお、本件は、2000 年 6 月 30 日の発表から 1 年以内に出願されているため、当該発表は、米国においては先行技術とはならない。

（３）プロダクトバイプロセスクレームの権利解釈
　日本及び欧州においても、心筋様細胞シート及び3次元構造体に係るクレームは、製法で特定された物として記載されたいわゆるプロダクトバイプロセスクレームとして特許成立している。本特許においては、出願経過において、先行技術との差異が製法の違いによるものであること（具体的には、本発明が基板表面から剥離したものであるのに対し、引用文献のものは基板に付着したである、等）を意見書において主張しているため、こうした出願経過を参酌すれば、本件特許は、製造方法に限定された発明に付与されたものとして権利解釈されるものになると思われる。
　しかし、日本においては、平成22年（ネ）第10043号 特許権侵害差止請求控訴事件(平成24年1月27日判決)により、プロダクトバイプロセスクレームの技術的範囲の解釈について、新たな基準が示された。この基準に沿えば、権利者側が「物の特定を直接的にその構造又は特性によることが出願時において不可能又は困難である」ことの立証を尽くせば、当該発明の技術的範囲は、特許請求の範囲に記載された製造方法に限定されることなく，同方法により製造される物と同一の物と解釈される余地もあり得るものと考えられる。

３－３　澤芳樹らの出願：出願２
３－３－１　概略
　本願は、2003 年 8 月 1 日出願の日本出願（特願 2003-285476）に基づく優先権を主張し、2004 年 2 月 2 日に㈱カルディオにより英語による国際出願が行われた後、日本、米国及び欧州に移行手続がとられ、国内移行手続後、出願人名義が㈱カルディオから㈱セルシードに変更された。この出願の出願当初の請求項は、請求項 1～21 が三次元構造体、請求項 22，23 が三次元構造体を含む医薬、請求項 24～26 が三次元構造体を製造する方法、に係るものであり、移植手術に耐え得る、実際の手術に使用可能な、培養によって生産され得る人工組織又はシートを提供すること、細胞治療に代わる新たな治療法を提供すること、特に、心筋以外の部分に由来する細胞を材料として移植手術に耐え得る人工組織を作製することを目的とするものである。
（１）日本出願の経過
　2006 年 1 月 30 日　　国内移行
　2006 年 2 月 20 日　　新規性の喪失の例外証明書提出書

2007 年 1 月 31 日　出願審査請求
2008 年 12 月 22 日　拒絶理由通知（特許法 29 条 1, 2 項、36 条 6 項 2 号）
2009 年 2 月 23 日　意見書, 補正書
2009 年 6 月 26 日　拒絶査定（特許法 29 条 2 項）
2009 年 9 月 28 日　不服審判請求, 補正書
2009 年 11 月 9 日　前置移管
2010 年 1 月 15 日　前置解除
2011 年 8 月 1 日　審尋
2011 年 9 月 30 日　回答書
2012 年 1 月 12 日　拒絶理由通知（特許法 36 条 6 項 2 号）
2012 年 1 月 24 日　意見書, 補正書
2012 年 2 月 15 日　特許審決
2012 年 3 月 9 日　登録

また、㈱セルシードは、不服審判請求と同時に分割出願（子出願）をしている。この子出願については、2012 年 2 月 7 日付で新規性欠如及び進歩性欠如の最初の拒絶理由通知を受けた。これに対し、補正書とともに意見書が提出されたが、補正違反ならびに新規性欠如及び進歩性欠如を示す最後の拒絶理由が通知された。これに対し、㈱セルシードは、更に意見書及び補正書を提出して応答し、現在、日本特許庁にて審査が行われている。なお、子出願の最初の拒絶理由通知の応答の際、子出願の分割出願（孫出願）がなされている。

（２）欧州出願の経過

2006 年 2 月 28 日　国内移行
2007 年 9 月 10 日　庁指令（EPC 54 条(2), 56 条, 84 条）
2008 年 6 月 26 日　意見書, 補正書
2010 年 2 月 25 日　庁指令
2010 年 9 月 7 日　意見書, 補正書
2011 年 6 月 28 日　庁指令（EPC 54 条(2), 56 条, 83 条, 84 条）
2012 年 1 月 9 日　意見書, 補正書
2013 年 1 月 24 日　口頭審査召集、庁指令（EPC 54 条, 56 条）

現在に至る。

また、欧州出願は、2010 年 9 月 30 日付で 2 つの分割出願がなされており、いずれも現在、欧州特許庁に係属中である。

（３）米国出願の経過

2006 年 1 月 31 日　国内移行

2009年 3月30日　限定要求
2009年 6月30日　応答書
2009年 7月14日　non-final OA (35 USC 102 (b))
2010年 1月14日　意見書, 補正書
2010年 4月15日　final OA (35 USC 112-1st, 102 (b), 103)
2010年10月13日　Notice of Appeal
2010年12月13日　RCE, 補正書
2011年 6月16日　non-final OA (35 USC 112-1st,-2nd, 102 (b), 103)
2011年12月16日　Notice of Appeal
2012年 7月16日　RCE, 補正書

現在に至る。

e 国際出願の詳細：PCT/JP2004/001024

2004年2月2日付で出願された国際出願の請求項は下記の26項であった。

1. A three-dimensional structure applicable to heart, comprising a cell derived from a part other than myocardium of an adult.

2. A structure according to claim 1, wherein the cell is a stem cell or a differentiated cell.

3. A structure according to claim 1, wherein the cell is a mesenchymal cell.

4. A structure according to claim 1, wherein the cell is derived from a myoblast.

5. A structure according to claim 4, wherein the myoblast is a skeletal myoblast.

6. A structure according to claim 1, wherein the cell is a fibroblast.

7. A structure according to claim 1, wherein the cell is a synovial cell.

8. A structure according to claim 1, wherein the cell is derived from a stem cell.

9. A structure according to claim 1, wherein the cell is derived from a subject, the structure being applied to the subject.

10. A structure according to claim 1, wherein the cell is not derived from a subject, the structure being applied to the subject.

11. A structure according to claim 1, wherein the structure expresses at least one non-adult heart marker selected from the group consisting of myosin heavy chain Ⅱa, myosin heavy chain Ⅱb, myosin heavy chain Ⅱd(Ⅱ

x), CD56, MyoD, Myf5, and myogenin .

12. A structure according to claim 11, wherein an expression level of the non-adult heart marker in the structure is at least 50% of an expression level of the non-adult heart marker in skeletal myoblasts.

13. A structure according to claim 1, wherein the three-dimensional structure expresses all of myosin heavy chain Ⅱa, myosin heavy chain Ⅱb, myosin heavy chain Ⅱd(Ⅱx) , CD56, MyoD, Myf5, and myogenin.

14. A structure according to claim 13 , wherein an expression level of each of myosin heavy chain Ⅱa, myosin heavy chain lib, myosin heavy chain Ⅱd(Ⅱx), CD56, MyoD, Myf5, and myogenin in the structure is at least about 50% of an expression level thereof in skeletal myoblasts.

15. A structure according to claim 13 , wherein an expression level of each of myosin heavy chain Ⅱa, myosin heavy chain lib, myosin heavy chain Ⅱd(Ⅱx), CD56, MyoD, Myf5, and myogenin in the structure is at least about 100% of an expression level thereof in skeletal myoblasts.

16. A structure according to claim 1, wherein the cell derived from a part other than myocardium is a cell not derived from heart .

17. A structure according to claim 1, wherein the applicability to heart includes applicability to myocardium.

18. A structure according to claim 1, comprising a monolayer cell sheet.

19. A structure according to claim 1, comprising a multilayer cell sheet.

20. A structure according to claim 19, wherein the multilayer cell sheet has biological connection.

21. A structure according to claim 20, wherein the biological connection is selected from the group consisting of connection via extracellular matrix, electrical connection, and connection without scaffold.

22. A medicament, comprising a three-dimensional structure according to any one of claims 1 to 21.

23. A medicament according to claim 22, wherein the heart has a disease or disorder selected from the group consisting of heart failure, ischemic heart disease , myocardial infarct , cardiomyopathy, myocarditis, hypertrophic cardiomyopathy, dilated phase hypertrophic cardiomyopathy, and dilated cardiomyopathy.

24. A method for producing a three-dimensional structure applicable to heart comprising a cell derived from a part other than myocardium of an

adult, the method comprising the steps of:
a) culturing the cell derived from the part other than myocardium of an adult on a cell culture support grafted with a temperature responsive macromolecule having an upper limit critical solution temperature or lower limit critical solution temperature to water of from 0° C to 80° C;
b) setting a culture medium temperature to the upper limit critical solution temperature or more or the lower limit critical solution temperature or less; and
c) detaching the cultured cell as a three-dimensional structure.
25. A method according to claim 24, wherein a treatment using a protein degrading enzyme is not performed in or before the detaching step.
26. A method according to claim 24, wherein the temperature responsive macromolecule is poly(N-isopropylacrylamide) .

国際調査機関は欧州特許庁であり、請求項1, 2, 8, 10～17, 22, 23については、米国Diacrin社の文献（US6432711）から新規性又は進歩性なし、請求項1, 5, 6, 9～17, 22, 23については、米国Diacrin社の文献（WO01/07568）から新規性又は進歩性なし、請求項1, 6, 10, 16, 17, 22, 23については、Kellarらの文献（Circulation, vol. 104, no. 17, pp. 2063-2068）から新規性又は進歩性なし、請求項18～21, 24～26については、米国Diacrin社の文献（US6432711）、清水らの文献（Circulation Research, 2002, vol. 90, no. 3, e40-e48.）、及び、日本循環器学会のホームページ上の岡野の発表（http://www.j-circ.or.jp/english/sessions/reports/66th-ss/okano.htm）から進歩性なしとされた。

e

2006年1月30日に㈱カルディオが日本語の翻訳文を提出して移行手続を行った。また、国内移行時に、2003年3月28日開催の「第67回日本循環器学会総会・学術集会」において発表されたことに基づく新規性喪失の例外の適用申請がなされた。翻訳文に記載された請求項は下記のとおりである。
【請求項１】成体の心筋以外の部分に由来する細胞を含む、心臓に適用可能な三次元構造体。
【請求項２】前記細胞は幹細胞または分化細胞である、請求項１に記載の三次元構造体。
【請求項３】前記細胞は間葉系細胞である、請求項１に記載の三次元構造体。
【請求項４】前記細胞が筋芽細胞に由来する、請求項１に記載の三次元構造体。

【請求項５】前記筋芽細胞が骨格筋芽細胞である、請求項４に記載の三次元構造体。
【請求項６】前記細胞が線維芽細胞である、請求項１に記載の三次元構造体。
【請求項７】前記細胞が滑膜細胞である、請求項１に記載の三次元構造体。
【請求項８】前記細胞が幹細胞に由来する、請求項１に記載の三次元構造体。
【請求項９】前記細胞は、前記三次元構造体が適用される被験体に由来する、請求項１に記載の三次元構造体。
【請求項１０】前記細胞は、前記三次元構造体が適用される被験体に由来しない、請求項１に記載の三次元構造体。
【請求項１１】前記三次元構造体は、ミオシン重鎖Ⅱa、ミオシン重鎖Ⅱb、ミオシン重鎖Ⅱd(Ⅱｘ)、CD56、MyoD、Myf５およびmyogeninからなる群より選択される少なくとも１つの非成体心臓マーカーを発現する、請求項１に記載の三次元構造体。
【請求項１２】前記構造体における非成体心臓マーカーは、骨格筋芽細胞における非心臓マーカーが発現するレベルの少なくとも５０％のレベルで存在する、請求項１１に記載の三次元構造体。
【請求項１３】前記三次元構造体は、ミオシン重鎖Ⅱa、ミオシン重鎖Ⅱb、ミオシン重鎖Ⅱd(Ⅱｘ)、CD56、MyoD、Myf5 および myogenin をすべて発現する、請求項１に記載の三次元構造体。
【請求項１４】前記ミオシン重鎖 IIa、ミオシン重鎖 IIb、ミオシン重鎖 IId(IIｘ)、ＣＤ５６、ＭｙｏＤ、Ｍｙｆ５およびｍｙｏｇｅｎｉｎはいずれも、骨格筋芽細胞が発現するレベルの少なくとも約５０％のレベルで存在する、請求項１３に記載の三次元構造体。
【請求項１５】前記ミオシン重鎖 IIa、ミオシン重鎖 IIb、ミオシン重鎖 IId(IIｘ)、ＣＤ５６、ＭｙｏＤ、Ｍｙｆ５およびｍｙｏｇｅｎｉｎはいずれも、骨格筋芽細胞が発現するレベルの少なくとも約１００％のレベルで存在する、請求項１３に記載の三次元構造体。
【請求項１６】前記心筋以外の細胞は、心臓に由来しない細胞である、請求項１に記載の三次元構造体。
【請求項１７】前記心臓への適用可能性は心筋への適用可能性を含む、請求項１に記載の三次元構造体。
【請求項１８】単層の細胞シートを含む、請求項１に記載の三次元構造体。
【請求項１９】複数の層の細胞シートを含む、請求項１に記載の三次元構造体。
【請求項２０】前記複数の層の細胞シートは、生物学的に結合している、請求項１９に記載の三次元構造体。
【請求項２１】前記生物学的結合は、細胞外マトリクスによる結合、電気的結

合およびスキャフォルドなしでの結合からなる群より選択される、請求項２０に記載の三次元構造体。
【請求項２２】請求項１～２１のいずれか１項に記載の三次元構造体を含む医薬。
【請求項２３】前記心臓は、心不全、虚血性心疾患、心筋梗塞、心筋症、心筋炎、肥大型心筋症、拡張相肥大型心筋症および拡張型心筋症からなる群より選択される疾患または障害を伴う、請求項２２に記載の医薬。
【請求項２４】成体の心筋以外の部分に由来する細胞を含む、心臓に適用可能な三次元構造体を製造する方法であって、
ａ）水に対する上限臨界溶解温度または下限臨界溶解温度が０～８０℃である温度応答性高分子がグラフティングされた細胞培養支持体上で、成体の心筋以外の部分に由来する細胞を培養する工程；
ｂ）培養液温度を、該上限臨界溶解温度以上または下限臨界溶解温度以下とする工程；および
ｃ）該培養した細胞を、三次元構造体として剥離する工程；
を包含する、方法。
【請求項２５】前記剥離時またはその前に、タンパク質分解酵素による処理がなされない、請求項２４に記載の方法。
【請求項２６】前記温度応答性高分子が、ポリ（Ｎ－イソプロピルアクリルアミド）である、請求項２４に記載の方法。

ee

出願人名義が㈱カルディオから㈱セルシードに変更されて審査請求された後、2008 年 12 月 12 日に、最初の拒絶理由が通知された。内容は下記のものである。
理由 1：特許法 29 条 1 項 1 号，29 条 2 項（請求項 1，4，5，9～26）

平成 18 年 2 月 20 日付けで本願出願人が提出した「新規性の喪失の例外証明書提出書」（以下、「証明書」という。）によれば、第 67 回日本循環器学会年次学術集会における発表（平成 15 年 3 月 28 日）により、骨格筋芽細胞を含む心筋再生用シート及びその製造方法の発明は当業者にとり公知になったものと認められる。また、上記発表により公知になった発明に基づいて、細胞の由来等を必要に応じて適宜変更してみることも当業者であれば適宜なし得る事項である。なお、本願は、上記証明書の提出をもって特許法 184 条の 14 の規定により特許法 30 条 1 項の規定を受けようをするものであるが、本願の発明者と上記証明書に示された発表者が重複していない上、証明書には特許を受ける権利の承継や、特許を受ける権利を有する者と発表者との関係について何ら示されていないから、本願は特許法 30 条 1 項の適用を受けることができない。

理由２：特許法 29 条１項３号，29 条２項
（i） 請求項１，６，９〜26
　岡野らの文献１（WO02/08387、本書の出願１の国際公開パンフレット)の特許請求の範囲には、各種心疾患治療用の心筋組織の細胞からなる心筋様培養細胞シート、及び、その製造方法が記載され、さらに、心筋組織の細胞には線維芽細胞が含まれる点についても記載されている。また、上記細胞シートにおいて、細胞の由来等を必要に応じて変更してみることも当業者であれば適宜なし得る事項である。
（ii） 請求項１，４，５，９〜23
　本発明者の澤、竹谷、宮川らの文献２（日本外科学会雑誌，2003 年４月，vol. 104，p. 422）には、骨格筋芽細胞を含む心筋再生用シートが記載されている。また、上記細胞シートにおいて、細胞の由来等を必要に応じて変更してみることも当業者であれば適宜なし得る事項である。
（iii） 請求項１，２，８〜23
　米国 Diacrin 社の文献３（US6432711）には、筋細胞に分化し、三次元ネットワークを提供するコンディションで培養され、各種心疾患を治療可能である胚性幹細胞が記載されている。また、上記細胞の由来や構造体の形状等を必要に応じて変更してみることも当業者であれば適宜なし得る事項である。
（iv） 請求項１，４〜６，９〜23
　米国 Diacrin 社の文献４（WO01/07568）には、ポリリジン等でコートされた表面で培養された、心組織障害を治療可能な骨格筋芽細胞及び線維芽細胞を含む構造体が記載されている。また、上記細胞の由来や構造体の形状等を必要に応じて変更してみることも当業者であれば適宜なし得る事項である。
(v) 請求項１，６，９〜23
　Suzuki らの文献５（Circulation，2001 年，Vol.104，pp.2063-2068）には、線維芽細胞を含有する、心臓に適用可能な三次元構造体が記載されている。また、上記細胞の由来や構造体の形状等を必要に応じて変更してみることも当業者であれば適宜なし得る事項である。
理由３：特許法 29 条２項
（i） 請求項 24〜26
　上記請求項に係る発明は、温度応答性高分子がグラフティングされた細胞培養支持体上で細胞を培養し、三次元構造体を製造する点で、それらの明示のない文献２〜５にそれぞれ記載の発明と相違するが、岡野らの文献１に示されるように、心臓に適用可能な三次元構造体の製造方法として、温度応答性高分子がグラフティングされた細胞培養支持体を用いることは当業者にとり公知であるから、文献２〜５にそれぞれ記載の心臓適用可能な構造体を製造する際に、その

製法として文献１に記載の方法を採用してみることは、当業者であれば容易に想到し得るものであって、当該事項による格別の効果も認められない。
(ii)　請求項1～6, 8～26
　岡野らの文献６（Journal of Artificial Organs, 2002, vol.5, pp.216-222）には、温度感受性高分子がグラフトされた培養支持体上で培養することにより、様々な細胞シートが作成可能であること、細胞シート技術が心筋組織再建に適用可能であること、骨髄幹細胞や筋芽細胞が心筋の再生に有用であることが記載されている。文献６には、心筋以外の部分に由来する細胞を含む細胞シートの製造例は示されていないが、文献６の上記記載に接した当業者であれば、同文献記載の心筋組織再建に適用可能な細胞シート技術を用いて、心筋再生に有用な骨髄幹細胞・筋芽細胞等の他の細胞（文献2～6）を細胞シート状構造体としてみることは容易に想到し得るものであって、当該事項による格別の効果も認められない。
理由４：特許法36条6項2号違反（請求項1～22, 24～26）
　請求項1, 24には、「心臓に適用可能な三次元構造体」という記載があるが、上記記載が「心臓に適用するための三次元構造体」を指すものであるのか、「心臓に適用可能」という単なる可能性を有する様々な三次元構造体を指すものであるのか、明確に把握できない。また、これらの請求項を引用する他の請求項についても同様である。なお、上記記載が後者を意味するものである場合、例えば、理化学研究所・石橋・セルメデシン㈱の出願（特開2003-144139号公報）や特開平2-192138号公報といった、心筋以外の部分に由来する細胞を含む三次元構造体を開示する先行技術文献に対して、上記請求項に係る発明は新規性を有しない旨の拒絶理由が生じ得る点についても留意されたい。

　これに対し、、㈱セルシードは、2009年2月20日、「成体の心筋以外の部分に由来する細胞」から筋芽細胞を除き、更に「三次元構造体」を「シート状」であることに特定する補正を行った。そして意見書で下記のとおり主張した。
理由１（特許法29条第1項第1号）、3（特許法29条2項）について：
　第67回日本循環器学会年次学術集会において発表（平成15年3月28日）された「自己由来筋芽細胞シートを用いた心筋形成法によって、機能が損なわれた心筋は再生される」という文書（証明書）には、飽くまでも筋芽細胞シート、並びに骨格筋芽細胞シートに関する記載がなされているに過ぎず、筋芽細胞以外の細胞シートについての記載は全くない。今回の手続補正により、当初の請求項１における「成体の心筋以外の部分に由来する細胞」から「筋芽細胞」を除外した（即ち、『成体の心筋以外の部分に由来する筋芽細胞以外の細胞』と補正した）ので、この理由１は最早解消したものと思料する。細胞の選定は、種々

の条件や実用性の詳細な検討、数々の試行錯誤、実験結果の解析・検討、等の過程を経て行われるものであり、適宜なし得るものではない。したがって、補正後の特許請求の範囲に記載された本願発明は上記発表により公知になった発明（証明書に記載された発明）に基づいて当業者が容易になし得たものではない。

理由2（特許法29条1項3号）、3（特許法29条2項）について：

岡野らの文献1は収縮弛緩機能を有する細胞シートに関するもので心筋組織中に存在する心筋細胞が必須のものである。文献1の中には、心筋組織に含まれる線維芽細胞を単独で用いること、その細胞シートを単独で用いることで心筋組織の再生がなされることは示唆すらされていない。したがって、補正後の本願発明は、文献1によってその新規性も進歩性も否定されることはないものと思料する。

本発明者の澤、竹谷、宮川らの文献2に記載される発明は筋芽細胞シート、並びに骨格筋芽細胞シートに関するものである。今回の手続補正で当該部分を除外したので、新規性に関する拒絶理由は解消した。また、細胞の選定は、種々の条件や実用性の詳細な検討、数々の試行錯誤、実験結果の解析・検討、等の過程を経て行われるものであって、適宜なし得るものではない。実際、文献2において、筋芽細胞シート並びに骨格筋芽細胞以外の細胞の利用可能性については、記載も示唆もない。したがって、補正後の特許請求の範囲に記載された本願発明は文献2の存在によってその新規性及び進歩性が否定されるものではない。

米国Diacrin社の文献3に示されている技術は、ES細胞（胚性幹細胞）から神経、並びに筋芽細胞を分化誘導するための方法に関するものである。その結果として得られる筋芽細胞は３次元ネットワーク（文献3には詳細は示されていないが、通常、塊状（スフェロイド状）のものとなる。）を形成すると同文献には記載されている。そして、文献3ではその筋芽細胞をどのように利用するかについては何ら記載がなく、また、このことにより従来技術で課題であった、１．移植細胞の障害損失、２．レシピエント心の注入時の組織障害、３．レシピエント心への組織供給効率、４．不整脈の発生、５．梗塞部位全体への治療の困難などの欠点（本願明細書段落段落【0007】）を解決しているのかどうかについても何ら記載がなく、また示唆もない。本発明は、移植手術に耐え得る、実際の手術に使用可能な、培養によって生産され得る人工組織又はシートを提供することを課題としている。本発明はまた、細胞治療に代わる新たな治療法を提供することを課題としている（本願明細書段落段落【0010】)。本発明はこのような課題を解決する手段を提供することに成功したものである。文献3の中には、本発明で示される細胞シートを用いることで心筋組織の再生がなされ

ることは何ら記載も示唆もない。したがって、補正後の本願発明は、文献3によってその新規性も進歩性も否定されない。

米国Diacrin社の文献4に示されている技術とは、培養器材表面にコーティングされたポリリジン等でコートされた表面上で培養された骨格筋芽細胞、線維芽細胞を回収し個々の細胞として心筋組織の再生に利用しようとするものである。この技術が本発明でいうところの細胞移植であり、１．移植細胞の障害損失、２．レシピエント心の注入時の組織障害、３．レシピエント心への組織供給効率、４．不整脈の発生、５．梗塞部位全体への治療の困難などの欠点（本願明細書段落段落【0007】）を有するものである。本発明は、移植手術に耐え得る、実際の手術に使用可能な、培養によって生産され得る人工組織又はシートを提供することを課題としている。本発明はまた、細胞治療に代わる新たな治療法を提供することを課題としている（本願明細書段落【0010】)。本発明はこのような課題を解決する手段を提供することに成功したものである。文献4の中には、本発明で示される細胞シートを用いることで心筋組織の再生がなされることは示されておらず、示唆もない。したがって、補正後の本願発明は、文献4によってその新規性も進歩性も否定されないものと思料する。

Suzukiらの文献5には三次元のスキャホールド（足場）を利用し、その中に皮膚由来の線維芽細胞を分散させそのまま心筋の再生を行うことが教示されている。文献5の技術はスキャホールドを利用するものであり、スキャホールドと心筋組織は付着しない。従って、そのスキャホールドに分散された線維芽細胞は上述した細胞移植と同様な環境にあり、細胞移植したときに同様な課題も生じる。本発明は、移植手術に耐え得る、実際の手術に使用可能な、培養によって生産され得る人工組織又はシートを提供することを課題とする。本発明はまた、細胞治療に代わる新たな治療法を提供することを課題とする（本願明細書段落段落【0010】)。本発明はこのような課題を解決する手段を提供することに成功したものである。文献5の中には、本発明で示される細胞シートを用いることで心筋組織の再生がなされることは示されておらず、示唆もない。したがって、補正後の本願発明は、文献5によってその新規性も進歩性も否定されない。

理由3（特許法29条2項）について：

岡野らの文献1は収縮弛緩機能を有する細胞シートに関する発明を開示するのみで、心筋組織中に存在する心筋細胞が必須のものである。本願発明の細胞シートは成体の心筋以外の部分に由来する細胞を含む、心臓に適用するためのシート状三次元構造体を製造する方法に関するものであるから、当業者であれば心筋細胞自体を使用する文献1の方法をそのまま適用することができるとは考えない。したがって、補正後の本願請求項に記載された製造方法の発明は、

たとえ当業者が文献 1～5 の記載を組み合わせたとしても、推考し得ない発明ではない。岡野らの文献 6 には reference 39～42 が引用されそれぞれで様々な細胞シート（血管内皮細胞シート、腎上皮細胞シート、表皮細胞シート、肝細胞シート／血管内皮細胞シート）が作られているが、それらが心筋組織に移植され心筋組織が再生することを示すものではなく、またそのことを示唆する記載はない。また、文献 6 で細胞シート技術が心筋組織の再生に有効と示されていると説示するが、文献 6 は心筋細胞シートに限られるものであり、また、同文献で示されている骨髄幹細胞や筋芽細胞が心筋の再生に有効であることは単に従来技術を紹介したに過ぎず、この記載がそのまま細胞シートにすると心筋組織の再生に有効であると考えることは飛躍し過ぎる。よってかかる文献 6 を文献 2～5 と組み合わせても、補正後の本願発明を想到することは困難であることが明らかである。したがって、補正後の本願発明は、たとえ当業者が文献 2～6 の記載を組み合わせたとしても、推考し得ない発明である。

理由 4（特許法 36 条 6 項 2 号）について：

「心臓に適用可能な三次元構造体」という記載を『心臓に適用するためのシート状三次元構造体』と補正した。これより不備は解消したものと思料する。

（３）拒絶査定

これに対し、拒絶査定がなされた。拒絶査定では、下記①～③のとおり、先の岡野らの文献 1、又は、Suzuki らの文献 5 に対する新規性あるいは進歩性欠如が解消していない旨が指摘されている。また、拒絶査定においては、下記④のとおり、サポート要件違反及び実施可能要件違反の旨も指摘された。

①先の文献 1 には、「本発明における心筋組織の細胞とは、成体内の心臓から得られた細胞であれば特に限定されるものではないが、通常、その中には心筋細胞、血管内皮細胞、及び繊維芽細胞等が含まれている」ことが明記されている。「成体の心筋以外の部分に由来する」なる記載により細胞を特定しようとしても、その由来に依らず、請求項に係る発明は、線維芽細胞を含有する心臓に適用するための細胞シート及びその製造方法自体として、文献 1 記載の発明と区別することができない。また、請求項には細胞が線維芽細胞のみで構成される旨の記載はなく、線維芽細胞等を含む三次元構造体に関するものであるから、出願人の主張は請求項の記載に基づいていない。したがって、本願出願人の上記主張は採用することができず、請求項に係る発明は依然として文献 1 から新規性及び進歩性を有しない。

②請求項には、スキャホールドの有無に関する記載はないし、先の文献 5 において、線維芽細胞が播種されたパッチ状（シート状）の三次元構造体の移植により心筋損傷を修復したことが記載されている以上、上記請求項に係る発明と

文献５記載の発明とは、その課題に依らず、線維芽細胞を含有する、心臓に適用するためのシート状三次元構造体である点で何ら区別することができない。したがって、本願出願人の主張は採用することができず、請求項に係る発明は依然として文献５から新規性及び進歩性を有しない。
③文献５において線維芽細胞を含有するシート状三次元構造体が心筋損傷の修復に有用であることが示される以上、先の岡野らの文献６自体に種々の細胞シートの心臓への適用可能性について明示がなくとも、文献６及び文献５に接した当業者であれば、文献６の細胞シート技術を文献５に記載の心臓修復作用を有する線維芽細胞についても適用してみようとすることは容易に想到し得るものであるといえる。また、文献６の Problems and future perspectives の項には心筋細胞の供給源として骨髄細胞等を用い得ることが記載されている以上、文献６に接した当業者であれば、シート状三次元構造体を構成する心筋細胞の供給源として骨髄細胞を用いたものを製造し、心臓への適用を期待してみることは通常に想起し得る事項であるといえる。したがって、本願出願人の上記主張は採用することができず、上記請求項に係る発明は依然として文献５, ６から進歩性を有しない。
④本願の発明の詳細な説明には、請求項３〜６に特定される数種の細胞をシート状三次元構造体として適用した場合に心機能を改善したことが実施例をもって示されるものの、その他の細胞種については実験データ等をもって何ら示されていない。一方、上記請求項に係る発明は、成体の心筋以外の部分に由来する筋芽細胞以外の様々な細胞を心臓に適用するためのシート状三次元構造体として用いることを包含するものであるところ、細胞種が大きく異なればその物性や性質も異なり得るものであり、適切な細胞の選定には種々の検討が必要であることが当該技術分野における技術常識であるといえる（この点については、平成 21 年２月 23 日付けで提出された意見書において本願出願人も述べているところである）。したがって、実施例で示された数種の細胞以外の細胞種によるシート状三次元構造体の製造やその心臓修復作用について裏付けのない発明の詳細な説明の記載によっては、本願発明の実施にあたり、多数の細胞についてシート状三次元構造体を製造し、それが心臓に適用可能か否かを確認するという当業者に期待し得る程度を越える試行錯誤を求めることとなる。そうすると、発明の詳細な説明には、上記請求項に係る発明について当業者が実施できる程度に明確かつ十分に記載されていると認めることはできず、また、これらの請求項に係る発明は、発明の詳細な説明において裏付けられた範囲を超える発明を含むものとなっている。

（４）不服審判請求

これに対し、㈱セルシードは、2011 年 9 月 28 日付で不服審判を請求し、同時に、「スキャフォルドを用いず、」に限定し、更に、「筋芽細胞以外の細胞」を「間葉系細胞、滑膜細胞及び幹細胞から選択される細胞からなる」に特定する等の補正を行った。そして、審判請求書において㈱セルシードは、補正により拒絶査定で指摘される拒絶理由は解消した旨を主張した。

（５）前置審査～審尋

前置審査では拒絶理由は解消せずに、2011 年 8 月 1 日に審尋がなされた。審尋に示された前置報告書では、以下の指摘があった。

上記手続補正によって補正された請求項 1 に記載の「成体の心筋以外の部分に由来する、間葉系細胞」について、Keller らの文献 4（Circulation, 2001, Vol.104, pp.2063-2068）に記載されるように、一般に、間葉系組織の細胞である間葉系細胞は筋芽細胞を包含するものであるから当該補正された請求項 1 に係る発明は、成体の心筋以外の部分に由来する筋芽細胞のみを使用する態様を包含するものであると認められる。よって、上記手続補正が、補正前の特許請求の範囲に記載された発明特定事項である『「成体の心筋以外の部分に由来する細胞」から「筋芽細胞」を除いた細胞』の限定的減縮に該当するものであるとは認められず、また、当該手続補正が、請求項の削除、誤記の訂正又は明瞭でない記載の釈明のいずれにも該当しないことは明らかである。したがって、この補正は、特許法 17 条の 2 第 4 項の各号に掲げるいずれの事項を目的とするものにも該当せず、同法 17 条の 2 第 4 項の規定に違反するものであるから、同法第 159 条 1 項において読み替えて準用する同法 53 条 1 項の規定により却下されるべきものである。

また、審判請求人が主張するように、上記平成 21 年 9 月 28 日付の手続補正書において補正された、請求項 1 に記載の「間葉系細胞」が、発明の詳細な説明の段落【0129】に例示されている、骨髄、脂肪細胞、又は滑膜細胞を意味するものであって、筋芽細胞を含まないものであり、当該補正が特許請求の範囲の限定的減縮を目的とするものであるとしても、補正後の請求項 1-19 に係る発明は、下記理由 1-4 により拒絶されるべきものであり、特許出願の際独立して特許を受けることができない。

理由 1：特許法 29 条 2 項

報告書において新たに引用する、清水らの文献 1（Circulation Research, 2002, vol.90, p.e40-e48）には、温度感受性細胞培養支持体上で、心筋細胞シートを製造し、得られた細胞シートを積層し、シート状三次元構造体を製造する方法が記載されている。また、従来、心筋組織の治療には様々な細胞が使用されており、その中でも心筋細胞や骨髄由来の多能性細胞が最も好ましいところ、こ

れまでは、細胞を成体に直接注射していたため、注射された細胞のほとんどが死滅してしまうといった課題があったこと、及び、生分解性のスキャフォールドを用いた三次元構造体を、心筋障害の修復に使用した報告もされているが、スキャフォールド内に細胞が十分に浸透しないことや、スキャフォールドが分解される際に炎症反応が生じるといった課題があったことが、それぞれ記載されており、一方で、上記心筋細胞シートを積層して得られるシート状三次元構造体を用いた場合には、上記課題を解決できる上に、当該構造体は、その大きさや形、厚さを自由にコントロールできるという利点を有しており、当該三次元構造体を心臓組織の修復に有用であることも記載されている。本願の上記請求項に係る発明と文献１に記載された発明を対比すると、前者は、本報告書において新たに引用する、Robert P. Lanza らの文献２（再生医学～ティッシュエンジニアリングの基礎から最先端技術まで～, 2002 年, 初版, p.677-678）に記載されるように、線維芽細胞や骨髄間質細胞を包含するものである、間葉系細胞を使用するものであるのに対して、文献１には、間葉系細胞を使用することが具体的に記載されていない点で相違する。ここで、本報告書において新たに引用する、Saito らの文献３（The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery, 2003, ７月, vol.126, p.114-122）には、骨髄間質細胞を注射することによって、心筋梗塞を治療する方法が記載されており、また、Suzuki らの文献４（原査定において引用した文献５に相当）には、スキャフォールドに線維芽細胞を播種して得た三次元構造体を用いて心筋損傷を修復したことが記載されている。してみれば、清水らの文献１に記載の上記シート状三次元構造体は、上述のとおり、細胞の直接注射や、スキャホールドを用いた三次元構造体に比して、その効果や取扱い性の点で優れたものであり、また、一般に、再生医療の分野において、同様の疾患に使用できる細胞を適宜置換し、その作用の向上を図ることは、当業者が通常行うことであるから、清水らの文献１に記載の発明において、心筋細胞に代えて、Saito, Suzuki らの文献３, ４にそれぞれ記載されるように、心筋組織の修復に有効であることが知られている、骨髄間質細胞や線維芽細胞を採用し、その効果を試験・確認してみることは当業者が容易に想到し得ることである。また、一般に、再生医療の分野において、組織再生作用を有する組成物を併用し、作用増強を図ることは、当業者が通常行うことであるから、本発明者の澤、竹谷、宮川らの文献５（原査定において引用した文献２に相当）に記載されるような、作用の増強を目的として、骨格筋芽細胞を含む心筋再生用シートを併用することも、当業者が適宜なし得ることである。そして、これらの点による格別な効果も認められない。
理由２, ３：特許法 36 条４項１号､同条６項１号
　本願の請求項１に係る発明は、スキャフォルドを用いず、成体の心筋以外の

部分に由来する、間葉系細胞又は幹細胞から選択される細胞からなる、心臓に適用するためのシート状三次元構造体に係るものである。しかしながら、当該間葉系細胞として、脂肪細胞を選択することができ、また、幹細胞としては、本願明細書の発明の詳細な説明の段落【0022】に記載されるように、神経幹細胞や表皮幹細胞といった多種多様な幹細胞を使用できるものである。しかしながら、発明の詳細な説明には、上記間葉系細胞として、線維芽細胞、又は滑膜細胞を使用した例が、また、幹細胞として、胚性幹細胞を使用した例が、それぞれ記載されているのみであり、その他の細胞を使用した例は何ら記載されていない。そして、一般に、細胞の種類が異なれば、当然、その物性や性質は異なるものであり、また、上記間葉系細胞に包含される、分化の進んだ体細胞である脂肪細胞や、上記幹細胞に包含される、分化の方向が限定されている組織幹細胞である神経幹細胞や表皮幹細胞といった幹細胞が、心臓に適用した際に、必ず、心臓修復作用を示すとは考えられず、発明の詳細な説明には、それを示す理論的な説明も何ら記載されていない。してみれば、成体の心筋以外の部分に由来する、間葉系細胞又は幹細胞からなるシート状三次元構造体が、必ず、発明の詳細な説明において具体的に記載された構造体と同様の作用を有するとはいえず、発明の実施にあたって、多種多様な細胞についてシート状三次元構造体を製造し、心臓に適用できるか否かを確認するという、当業者に期待しうる程度を越える試行錯誤を求めることとなる。よって、この出願の発明の詳細な説明は、当業者が請求項1に係る発明を実施することができる程度に明確かつ十分に記載されているとも、十分な裏付けをもって記載されているとも認められない。請求項2～19についても同様である。
理由4：特許法36条6項2号
　請求項1に記載の「幹細胞」が、それぞれ具体的にどのような細胞を包含するのか、その範囲が不明である。よって、請求項1に係る発明は明確でない。請求項1を引用する請求項2～15、及び請求項16～19についても同様である。

　この審尋に対し、2011年9月30日に以下の内容の回答書が提出されている。
　出願人は、「間葉系細胞」及び「幹細胞」との記載を、それぞれ「間葉系幹細胞」及び「胚性幹細」に補正を行うことを希望する。上記補正案の請求項1においては、本件明細書の段落0128に基づいて、間葉系細胞を間葉系幹細胞に特定した。間葉系幹細胞は、筋芽細胞や線維芽細胞と全く性質の異なる別個の細胞であって、これらを概念として包含するものではない。なお、Lanzaらの文献2は間葉系幹細胞が筋芽細胞や線維芽細胞等に分化する能力を有することを記載しているに過ぎない。従って、上記のような補正は、拒絶査定時の請求項1における「成体の心筋以外の部分に由来する筋芽細胞以外の細胞」の限定的減

縮に該当し、特許法17条の2第4項各号に規定される事項を目的とするものであるため、補正案における請求項1についてのご指摘は解消すると思料する。同様の補正を行った補正案における請求項16についてのご指摘も解消すると思料する。

上記の補正案の請求項1においては、成体の心筋以外の部分に由来する細胞が間葉系幹細胞、滑膜細胞、及び胚性幹細胞から選択されるものに特定される。清水らの文献1は、新生児ラットの心筋細胞から心筋細胞シートを作成し、複数の心筋細胞シートを重ね合わせて積層体を作成したことを記載する。Lanzaらの文献2は、間葉系幹細胞が骨髄間質細胞や線維芽細胞に分化する能力を有することを記載する。Saitoらの文献3は、骨髄間質細胞が冠状動脈を介して目的の箇所に送達され、瘢痕組織において心筋細胞に分化し、心機能が改善されることを記載する。Suzukiらの文献4は、心外膜パッチとして足場を有する3Dヒト表皮線維芽細胞を、梗塞心臓組織の損傷部位に適用したことを記載する。上記説明したとおり、間葉系幹細胞は骨髄間質細胞や線維芽細胞と性質の全く異なる別個の細胞であって、これらを包含するものではない。そして、間葉系幹細胞に関する記載や示唆は、文献1～4のいずれにおいても見当たらない。同様に、滑膜細胞及び胚性幹細胞に関する記載や示唆も、文献1～4のいずれにおいても見当たらない。従って、文献1～4の記載に基づいたとしても、上記補正案における請求項1に記載の発明の構成に想到することはできない。

更に、補正案における請求項1に係る発明は優れた効果を発揮する。本件明細書は、「本発明によって、移植可能な人工組織が提供される。このような組織は、従来技術では達成不可能な大きさを達成し、しかも強度も優れていることから、従来人工物での移植処置が考えられなかった部位の処置が可能になった。本発明によって、心筋のみならずそれ以外の部分に由来する細胞を材料として人工組織又は三次元構造体を提供することが可能となった。従って、自己の心筋以外の部分を材料として移植治療を行うことが可能となった。」と記載する（本件明細書、段落0016）。例えば、本件明細書の実施例5は、滑膜細胞の細胞シートを心筋梗塞モデル動物に移植した結果について、「細胞シートを移植した群では心機能の収縮性、拡張性が改善している。さらに心筋梗塞部分に移植細胞の生着を確認した。」と記載する（本件明細書、段落0320）。本発明において適用する細胞に関する記載すら存在しない文献1～4の記載を参照したとしても、本発明による上記の顕著な効果を予測することは困難であると思料する。

上記補正案における請求項1においては、幹細胞が胚性幹細胞に特定される。本件明細書の実施例6は、胚性幹細胞を用いた具体例を示している。胚性幹細胞と間葉系幹細胞の関係について、本件明細書は、「『幹細胞』とは、自己複製能を有し、多分化能（すなわち多能性）（「pluripotency」）を有する細胞をい

う。・・・本明細書では幹細胞は、胚性幹（ＥＳ）細胞又は組織幹細胞（組織性幹細胞、組織特異的幹細胞又は体性幹細胞ともいう）であり得るがそれらに限定されない。・・・本明細書において使用される場合は、幹細胞は好ましくは胚性幹細胞であり得るが、状況に応じて組織幹細胞も使用され得る。」と記載し（本件明細書の段落 0021）、更に「組織幹細胞は、例えば、皮膚系、消化器系、骨髄系、神経系などに分けられる・・・骨髄系の組織幹細胞としては、造血幹細胞、間葉系幹細胞などが挙げられる。」（本件明細書の段落 0022）と記載し、組織幹細胞としての間葉系幹細胞が胚性幹細胞と同様に使用できることを記載する。そして、間葉系幹細胞が筋肉細胞等への分化能を有することが本件明細書の段落 0026 に記載され、線維芽細胞や筋芽細胞等の心臓修復に寄与する細胞に分化できることが文献 2 に記載されている。上記のような本件明細書及び文献 2 の記載に接した当業者であれば、間葉系幹細胞を適用した場合においても胚性幹細胞と同様に、三次元構造体を得ることができ、当該三次元構造体が心臓に適用できることを理解すると思料する。これを補足する資料として、参考資料１（Nat Med. 2006 Apr;12(4):459-65）を提出する。参考資料 1 は、本発明に関する間葉系幹細胞（MSC）が単層シートを形成し、当該シートを心筋の瘢痕部位に移植したこと（参考資料 1、2 頁、”Preparation and transplantation of monolayered MSCs”、及び図 1)、及び MSC の単層シートの移植が心組織再生の新たな治療的戦略となり得ることを記載する（参考資料 1、Abstract, 下から 3～1 行）。なお、本件明細書の段落 0101 に記載されているように、本発明に係る三次元構造体は、一層でもあり得るため、上記の MSC の単層シートは本発明の範囲に含まれる。そして、MSC の単層シートの効果について、参考資料 1 は、例えば、次のように記載する：「左心室拡張終期圧の増加（LVEDP）及び左心室の圧力の最大及び最少変化率（dP/dt）の減衰によって示されるように、冠状動脈結紮後 8 週で心不全が発症した。しかしながら、単層 MSC の自家移植によって LVEDP が減少した（Fig.5a)。左心室の最大及び最少 dP/dt は、MSC 群において有意に改善された（Fig.5b,c)。我々は、これらの血行動態の改善を DFB 群において観察できなかった。MSC 群は、移植後 4 週の DFB 及び未処置群に比べて、右心室及び肺の重量が有意に少なかった（Supplementary Table 1 online)。これらの結果は、単層化した MSC の移植は、慢性心不全を有するラットにおいて、有益な血行動態の効果をもたらすことを示唆する。」（参考資料 1, 3 頁、” Effect of monolayered MSC on cardiac function “の 1 段落）;「Kaplan-Meier 生存曲線は、冠状動脈結紮後 4 週の生存率は、未処理と MSC 群との間で有意な相違がないことを示した（Fig.5h)。しかしながら、顕著に、単層化された MSC の移植後はラットの死亡は観察されなかった。従って、移植後の生存率は、未処理群におけるよりも MSC 群において著しく高かった（移植後 4 週における生存は、MSC 群

100%に対し、未処理群 71%、long-rank test, P<0.05)。」(参考資料 1, 3 頁, ”Survival analysis)。上記の参考資料１の記載から、MSC の単層シートを心臓に移植することによって心臓の機能が改善されることは明らかである。以上の理由により、補正案における請求項１等に係る発明は、当業者が実施可能な程度に本件明細書に記載されているため、拒絶理由には該当しないと思料する。
上記補正案における請求項１においては、「幹細胞」を「胚性幹細胞」に特定し、その範囲を明確なものとした。従って、請求項１等についての拒絶理由は解消する。

（６）審判官の合議体からの拒絶理由通知、及び、これに対する出願人の対応
その後、2012 年 1 月 12 日に審判官の合議体から、明確性要件違反の拒絶理由が通知された。この拒絶理由通知では、回答書記載の補正案のとおり補正をすれば、この拒絶理由は解消できる旨も記載された。
そのため、2012 年 1 月 24 日に、回答書に記載された補正案どおりの補正が行われた。

（７）特許付与内容：特許第 4943844 号
2012 年 2 月 3 日付で特許審決が送達され、特許が付与されている。最終請求項は下記の 19 項である。
【請求項１】　スキャフォルドを用いず、成体の心筋以外の部分に由来する間葉系幹細胞、滑膜細胞、及び胚性幹細胞から選択される細胞からなる、心臓に適用するためのシート状三次元構造体。
【請求項２】　前記細胞は、前記シート状三次元構造体が適用される被験体に由来する、請求項１に記載のシート状三次元構造体。
【請求項３】　前記細胞は、前記シート状三次元構造体が適用される被験体に由来しない、請求項１に記載のシート状三次元構造体。
【請求項４】　前記シート状三次元構造体は、ミオシン重鎖IIa、ミオシン重鎖IIb、ミオシン重鎖IId(IIｘ)、ＣＤ５６、ＭｙｏＤ、Ｍｙｆ５およびｍｙｏｇｅｎｉｎからなる群より選択され
る少なくとも１つの非成体心臓マーカーを発現する、請求項１ないし３のいずれか１項に記載のシート状三次元構造体。
【請求項５】　前記シート状構造体における非成体心臓マーカーは、骨格筋芽細胞における非心臓マーカーが発現するレベルの少なくとも５０%のレベルで存在する、請求項４に記載のシート
状三次元構造体。
【請求項６】　前記シート状三次元構造体は、ミオシン重鎖IIa、ミオシン重鎖

IIb、ミオシン重鎖IId(IIｘ)、ＣＤ５６、ＭｙｏＤ、Ｍｙｆ５およびｍｙｏｇｅｎｉｎをすべて発現する、請求項１ないし５のいずれか１項に記載のシート状三次元構造体。
【請求項７】　前記ミオシン重鎖IIa、ミオシン重鎖IIb、ミオシン重鎖IId(IIｘ)、ＣＤ５６、ＭｙｏＤ、Ｍｙｆ５およびｍｙｏｇｅｎｉｎはいずれも、骨格筋芽細胞が発現するレベルの少なくとも約５０%のレベルで存在する、請求項６に記載のシート状三次元構造体。
【請求項８】　前記ミオシン重鎖IIa、ミオシン重鎖IIb、ミオシン重鎖IId(IIｘ)、ＣＤ５６、ＭｙｏＤ、Ｍｙｆ５およびｍｙｏｇｅｎｉｎはいずれも、骨格筋芽細胞が発現するレベルの少なくとも約１００%のレベルで存在する、請求項７に記載のシート状三次元構造体。
【請求項９】　単層の細胞シートを含む、請求項１ないし８のいずれか１項に記載のシート状三次元構造体。
【請求項１０】　複数の層の細胞シートを含む、請求項１ないし８のいずれか１項に記載のシート状三次元構造体。
【請求項１１】　前記複数の層の細胞シートは、生物学的に結合している、請求項１０に記載のシート状三次元構造体。
【請求項１２】　複数の細胞シートの一部に筋芽細胞からなる細胞シートを含む、請求項１０または１１に記載のシート状三次元構造体。
【請求項１３】　筋芽細胞が骨格筋芽細胞である、請求項１２に記載のシート状三次元構造体。
【請求項１４】　請求項１ないし１３のいずれか1項に記載のシート状三次元構造体を含む医薬。
【請求項１５】　前記心臓は、心不全、虚血性心疾患、心筋梗塞、心筋症、心筋炎、肥大型心筋症、拡張相肥大型心筋症および拡張型心筋症からなる群より選択される疾患または障害を伴う、請求項１４に記載の医薬。
【請求項１６】　成体の心筋以外の部分に由来する間葉系幹細胞、滑膜細胞、及び胚性幹細胞から選択される細胞を含む、心臓に適用するためのシート状三次元構造体を製造する方法であって、
ａ）水に対する上限臨界溶解温度または下限臨界溶解温度が０～８０℃である温度応答性高分子がグラフティングされた細胞培養支持体上で、成体の心筋以外の部分に由来する間葉系幹細胞、滑膜細胞、及び胚性幹細胞から選択される細胞を培養する工程；
ｂ）培養液温度を、該上限臨界溶解温度以上または下限臨界溶解温度以下とする工程；および
ｃ）該培養した細胞を、シート状三次元構造体として剥離する工程；

を包含する、前記方法。
【請求項１７】　前記剥離前に、培地にアスコルビン酸またはその誘導体を加えることを特徴とする、請求項１６に記載の方法。
【請求項１８】　前記剥離時またはその前に、タンパク質分解酵素による処理がなされない、請求項１６または１７に記載の方法。
【請求項１９】　前記温度応答性高分子が、ポリ（Ｎ－イソプロピルアクリルアミド）である、請求項１６または１７に記載の方法。

３－３－４　日本分割出願の詳細：特願 2009-223536

（１）出願内容

親出願の不服審判請求と同時に親出願の日本移行の内容で出願をし、2011 年 10 月 28 日付けで審査請求をした。これと同時に行った自発補正により補正された請求項は、下記 13 項であった。

【請求項１】　スキャフォルドを用いず、成体の心臓を構成する心筋組織以外の部分に由来する筋芽細胞からなり、心臓疾患に適用するために細胞培養支持体から単離された、シート状筋芽細胞三次元構造体。
【請求項２】　筋芽細胞が骨格筋芽細胞である、請求項１に記載のシート状筋芽細胞三次元構造体。
【請求項３】　前記細胞は、前記シート状筋芽細胞三次元構造体が適用される被験体に由来する、請求項１、２のいずれか１項に記載のシート状筋芽細胞三次元構造体。
【請求項４】　複数の層の細胞シートを含む、請求項１～３のいずれか１項に記載のシート状筋芽細胞三次元構造体。
【請求項５】　前記三次元構造体の厚みが５０μｍ以上である、請求項１～４のいずれか１項に記載のシート状筋芽細胞三次元構造体。
【請求項６】　前記三次元構造体が、ミオシン重鎖 IIa、ミオシン重鎖 IIｂ、ミオシン重鎖 IIｄ（IIｘ）、ＣＤ５６、ＭｙｏＤ，Ｍｙｆ５およびｍｙｏｇｅｎｉｎからなる群より選択される少なくとも１つの非成体心臓マーカーを発現する、請求項１～５のいずれか１項に記載のシート状筋芽細胞三次元構造体。
【請求項７】　請求項１～６のいずれか１項に記載のシート状筋芽細胞三次元構造体を含む心臓疾患に適用するための医薬。
【請求項８】　サイトカインまたは増殖因子が併用される、請求項７記載の医薬。
【請求項９】　前記心臓は、心不全、虚血性心疾患、心筋梗塞、心筋症、心筋炎、肥大型心筋症、拡張相肥大型心筋症および拡張型心筋症からなる群より選択される疾患または障害を伴う、請求項７、８のいずれか１項に記載の医薬。

【請求項１０】　スキャフォルドを用いず、成体の心臓を構成する心筋組織以外の部分に由来する筋芽細胞からなる、心臓疾患に適用するためのシート状筋芽細胞三次元構造体を製造する方法であって、
ａ）水に対する上限臨界溶解温度またｓは下限臨界溶解温度が０～８０℃である温度応答性高分子が被覆された細胞培養支持体上で、成体の心筋以外の部分に由来する細胞を培養する工程；
ｂ）培養液温度を、該上限臨界溶解温度以上または下限臨界溶解温度以下とする工程；および
ｃ）該培養した細胞を、細胞培養支持体からシート状筋芽細胞三次元構造体として剥離する工程；
を包含する、方法。
【請求項１１】　前記剥離前に、培地にアスコルビン酸またはその誘導体を加えることを特徴とする、請求項１０記載の方法。
【請求項１２】　前記剥離時またはその前に、タンパク質分解酵素処理がなされない、請求項１０、１１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１３】　前記温度応答性高分子が、ポリ（Ｎ－イソプロピルアクリルアミド）である、請求項１０～１２のいずれか１項に記載の方法。

（２）最初の拒絶理由通知、及び、これに対する出願人の対応
2012 年 2 月 7 日に最初の拒絶理由が通知された。内容は下記のものである。
理由 1, 3：特許法 29 条 1 項 1 号, 29 条 2 項
特許法 44 条 4 項の規定により本願と同時に提出されたとみなされる、本願の原出願（特願 2006-519056 号）に関して本願出願人が提出した「新規性の喪失の例外証明書提出書」（以下、「証明書」という。）によれば、第 67 回日本循環器学会年次学術集会における発表（平成 15 年 3 月 28 日）により、骨格筋芽細胞を含む心筋再生用シート及びその製造方法の発明は当業者にとり公知になったものと認められる。また、上記発表により公知になった発明に基づいて、細胞の由来等を必要に応じて適宜変更してみることも当業者であれば適宜なし得る事項である。なお、本願は、上記証明書の提出をもって特許法第 30 条第 1 項の規定を受けようとするものであるが、本願の発明者と上記証明書に示された発表者が重複していない上、証明書には特許を受ける権利の承継や、特許を受ける権利を有する者と発表者との関係について何ら示されていないから、本願は特許法第 30 条第 1 項の適用を受けることができない。
理由 2, 3：特許法 29 条 1 項 3 号, 29 条 2 項
本発明者の澤、竹谷、宮川らの文献 1（日本外科学会雑誌, 2003 年 4 月, vol. 104, p. 422）には、骨格筋芽細胞を含む二層の心筋再生用シートが記載されている。

また、上記細胞シートにおいて、細胞の由来、シートの厚み、併用薬剤等を必要に応じて変更してみることも当業者であれば適宜なし得る事項である。したがって、請求項1〜9に係る発明は、文献1に記載された発明であり、また、同文献の記載に基づいて当業者が容易に想到することができたものである。なお、文献1にはシート適用時にスキャフォルドを用いたことの記載はなく、同文献記載の三次元構造体にスキャフォルドは用いられていないものと認められるが、仮に、スキャフォルドについて明示のない点をもって本願発明と文献1記載の発明とが相違すると解したとしても、上記請求項に関しても下記に述べる拒絶理由が存在する。
理由3：特許法29条2項
(i)　請求項に係る発明は、温度応答性高分子がグラフティングされた細胞培養支持体上で細胞を培養し、スキャフォルドを用いない三次元構造体を製造する点で、それらの明示のない文献1に記載の発明と相違するが、清水らの文献２（Journal of Artificial Organs, 2002, vol.5, pp.216-222)、岡野の文献3（WO02/08387、本書の出願1の国際公開パンフレット）に示されるように、心臓に適用可能な三次元構造体の製造方法として、温度応答性高分子がグラフティングされた細胞培養支持体を用いることは当業者にとり公知であるから、文献1にそれぞれ記載の心臓適用可能な構造体を製造する際に、その製法として文献2, 3に記載の方法を採用してみることは、当業者であれば容易に想到し得るものであって、当該事項による格別の効果も認められない。
(ii)　清水らの文献2には、温度感受性高分子がグラフトされた培養支持体上で培養することにより、様々な細胞シートが作成可能であること、細胞シート技術が心筋組織再建に適用可能であること、さらに、筋芽細胞が心筋の再生に有用である点についても記載されている。清水らの文献2には、心筋以外の部分に由来する細胞を含む細胞シートの製造例は示されていないが、文献2の上記記載に接した当業者であれば、同文献記載の心筋組織再建に適用可能な細胞シート技術を用いて、心筋再生に有用な筋芽細胞についても細胞シート状構造体を製造し、心臓疾患治療作用を期待することは容易に想到し得るものであって、当該事項による格別の効果も認められない。

それに対し、出願人は、2012年5月31日、下記のとおり応答した。
理由1及び3：　今回の補正により、補正後の請求項1に係る発明は、骨格筋芽細胞を構成細胞とする、虚血性心疾患及び拡張型心筋症からなる群から少なくとも1つ選ばれる心臓疾患に適用される、収縮したシート状筋芽細胞三次元構造体に限定された。本件の原出願（特願2006-519056号）に関して提出された「新規性の喪失の例外証明書提出書」（以下、証明書）に添付された第67回日

本循環器学会年次学術集会における発表資料（以下、発表資料）には、例えば、「ＳＭシート移植は、心臓再構築を軽減し、心機能を改善し、そして、損なわれた心筋を再生した。」と記載している（発表要旨の翻訳文の「結論」）。しかし、ラットの梗塞心臓に細胞シートを移植したこと、即ち心筋梗塞への適用が記載されているのみであり、虚血性心疾患や拡張型心筋症への適用、及び細胞シートの収縮について、前記発表資料は一切記載していない。従って、補正後の請求項１に係る発明は、上記の発表資料に記載された発明には該当しない。そして、虚血性心疾患や拡張型心筋症に適用したことや細胞シートが収縮していることに関する記載がない以上、発表資料の記載に基づいて、補正後の請求項に係る発明に想到することは、当業者にとって容易なことでない。

理由 2 及び 3：　補正後の請求項 1 に係る発明は、骨格筋芽細胞を構成細胞とする、虚血性心疾患及び拡張型心筋症からなる群から少なくとも１つ選ばれる心臓疾患に適用される、収縮したシート状筋芽細胞三次元構造体に関する。本発明者の澤、竹谷、宮川らの文献１には、二層の筋芽細胞シートを梗塞ラットの心臓に移植することによって、移植後 4 週間で心機能が有意に改善したこと等が記載されている。しかし、虚血性心疾患及び拡張型心筋症への適用については、文献 1 には記載も示唆もない。そして、構成細胞としての骨格筋芽細胞、及び細胞シートが収縮していることに関する記載も、文献 1 にはない。従って、補正後の請求項 1 に係る発明は、文献 1 に記載された発明には該当しない。そして、文献 1 に虚血性心疾患及び拡張型心筋症への適用、構成細胞としての骨格筋芽細胞、及び細胞シートの収縮について記載や示唆がない以上、当該文献に基づいて補正後の請求項 1 に係る発明に想到することは、当業者にとって容易なことではない。

理由３：　今回の補正により、補正後の請求項 1 に係る発明は、骨格筋芽細胞を構成細胞とする、虚血性心疾患及び拡張型心筋症からなる群から少なくとも１つ選ばれる心臓疾患に適用される、収縮したシート状筋芽細胞三次元構造体に限定された。本発明者の澤、竹谷、宮川らの文献１は細胞シートを梗塞心臓に適用したことを記載するのみであり、虚血性心疾患や拡張型心筋症に適用したこと、骨格筋芽細胞を構成細胞とすること、及びシート状筋芽細胞三次元構造体が収縮したものであることについては記載や示唆しない。清水らの文献 2 は、ヌードラットの皮下に移植された新生児ラットの心筋細胞シートを積層した心筋グラフトからエレクトログラムが検出されたことを記載する。岡野の文献 3 には、心筋梗塞等の疾患等へ細胞シート等を適用することが記載されている。即ち、文献 2 及び 3 は、虚血性心疾患や拡張型心筋症への適用、構成細胞としての骨格筋芽細胞、及びシート状筋芽細胞三次元構造体の収縮について記載や示唆しない。従って、文献 1～3 に記載された発明に基づいて、補正後の請

求項１に係る発明に想到することは当業者にとって容易なことではない。
理由３:　補正後の請求項１に係る発明は、骨格筋芽細胞を構成細胞とする、虚血性心疾患及び拡張型心筋症からなる群から少なくとも１つ選ばれる心臓疾患に適用される収縮したシート状筋芽細胞三次元構造体に限定されたこと、さらに、清水らの文献２は虚血性心疾患や拡張型心筋症への適用、骨格筋芽細胞を構成細胞とすること、及びシート状筋芽細胞三次元構造体の収縮について記載や示唆しない。従って、文献２に記載された発明に基づいたとしても、補正後の請求項１に係る発明に想到することは、当業者といえども容易なことではない。

（３）最後の拒絶理由通知、及び、これに対する出願人の対応

2012 年 6 月 27 日に、最後の拒絶理由が通知された。内容は下記のものである。
理由１：特許法 17 条の２第３項違反

本願出願人は平成 24 年 4 月 6 日付けで手続補正書を提出し、特許請求の範囲を補正した。その中で、補正後の請求項１及び８には、三次元構造体の構成細胞が「骨格筋芽細胞」であり、「収縮した」シート状の筋芽細胞三次元構造体である旨が特定されているが、本願の当初明細書等には、心筋細胞からなるシートが収縮弛緩機能を保持し自己収縮することは記載されるものの（例えば [0141]，実施例 1)、骨格筋芽細胞から構成される三次元構造体が「収縮した」シートとなることは明記されていない。そして、心筋細胞以外の、骨格筋芽細胞のような細胞が収縮したシートとなることが出願時の技術常識であるとも認められないから、骨格筋芽細胞を構成細胞とする収縮したシート状筋芽細胞三次元構造体は、当初明細書等の記載から自明な事項、すなわち、その記載がなくても、当初明細書等の記載に接した当業者であれば、出願時の技術常識に照らして、その意味であることが明らかであって、その事項がそこに記載されているのと同然であると理解する事項であるということはできず、上記補正は新たな技術的事項を導入するものといえる。また、本願発明の骨格筋芽細胞を構成細胞とするシート状三次元構造体が収縮したものとなることが出願時の技術常識であり、当該シートが本願の当初明細書等に記載されたものであったとしても、以下に示す拒絶理由が存在する。
理由２，４：特許法 29 条１項１号，29 条２項

特許法 44 条 4 項の規定により本願と同時に提出されたとみなされる、本願の原出願（特願 2006-519056 号）に関して本願出願人が提出した「新規性の喪失の例外証明書提出書」（以下、「証明書」という。）によれば、第 67 回日本循環器学会年次学術集会における発表（平成 15 年 3 月 28 日）により、スキャフォルドを用いない、骨格筋芽細胞を含む、梗塞心筋、すなわち虚血性心疾患（要

すれば本願明細書[0114]参照）の再生用シート、及び、温度感受性高分子がグラフトされた培養支持体を用いた当該シートの製造方法の発明は当業者にとり公知になったものと認められる。同証明書によれば、上記発表において当該シートが「収縮した」ものである点について触れられていないが、本願発明でいう「収縮した」なる記載は、いつの時点の何に比して収縮したものであるのか明らかでなく、当該記載の有無をもって上記請求項に係る発明と当該発表により公知になった発明とが相違するということはできない。また、文献 8〜10（岡野ら、再生医工学, 1999, vol. 52, No.12, pp.1251-1255；大和ら、蛋白質核酸酵素, 2000 年, vol.45, No.10, pp.1766-1794; Hirose ら、Biomacromolecules, 2000, vol.1, pp.377-381）の記載によれば、温度感受性高分子がグラフトされた培養支持体を用いてスキャフォルドを用いずに作成された細胞シートは、支持体から剥離する際に、細胞骨格に起因する収縮力により剥離前に比して収縮するものであるから、上記発表により公知になった細胞シートも、同様に「収縮した」ものであると認められる。さらに、当該発表により公知になった発明に基づいて、細胞の由来等を必要に応じて適宜変更してみることも当業者であれば適宜なし得る事項である。よって、上記請求項に係る発明は、上記発表により公知になった発明であり、また、同発明に基づいて当業者が容易に想到することができたものである。
理由 3, 4：特許法 29 条 1 項 3 号, 29 条 2 項
　本発明者の澤、竹谷、宮川らの文献 1 には、骨格筋芽細胞含有シート（SM-sheets；要すれば Ahmad らの文献 4 の 1 段落参照）を心筋梗塞、すなわち虚血性心疾患の治療に用いること、及び、同シートの適用により心機能が向上し、心筋を再生することが開示されている。同文献には当該シートが「収縮した」ものである点については記載されていないが、本願発明でいう「収縮した」なる記載は、いつの時点の何に比して収縮したものであるのか明らかでなく、当該記載の有無をもって上記請求項に係る発明と文献 1 記載の発明とが相違するということはできない。また、細胞の由来や併用薬剤、シート厚み等は当業者が適宜設定すべき事項である。さらに、Suzuki らの文献 6(Circulation,2001, vol.104 Suppl.1, pp.I213-I217）に示されるように、骨格筋芽細胞が拡張型心筋症のような心機能不全の治療においても用いられ得ることは当業者にとり公知であったから、文献 1 記載の細胞シートについて、虚血性心疾患の治療のみならず拡張型心筋症の治療においても用いてみることは、当業者であれば容易に想到することができたものである。文献 1 には、シート状三次元構造体にスキャフォルドが用いられることの記載はなく、同構造体においてスキャフォルドは用いられていないと認められるが、スキャフォルドについての明示のない点を相違点と解したとしても、以下に拒絶理由が存在する。

理由４：特許法 29 条 2 項
（i） 先の清水らの文献 2、及び、先の岡野らの文献 3 に示されるように、心臓に適用可能な三次元構造体の製造方法として、温度応答性高分子がグラフティングされた細胞培養支持体を用いて、スキャフォルドを用いずに細胞シートを製造することは当業者にとり公知であるから、本発明者の澤、竹谷、宮川らの文献 1 に記載の心臓適用可能な構造体を製造する際に、その製法として文献 2,3 に記載の方法を採用してみることは、当業者であれば容易に想到し得るものである。そして、そのようスキャフォルドを用いずに温度感受性高分子がグラフトされた培養支持体を用いて作成された細胞シートは、岡野らの文献 8、大和らの文献 9、Hirose らの文献 10 の記載からみて、「収縮した」細胞シートであることが明らかである。また、細胞の由来や併用薬剤、シート厚み等は当業者が適宜設定すべき事項である。そして、これらの事項による格別の効果も認められない。
（ii） Ahmad らの文献 4 には、N-イソプロピルアクリルアミド高分子でコートされた培養皿を用いて作成された骨格筋芽細胞シートの適用により、心筋再生が可能であることが記載されている。上記請求項に係る発明と文献４記載の発明とを対比すると、前者は虚血性心疾患や拡張型心筋症の治療に用いるものである点、及び、温度応答性高分子が被覆された細胞培養支持体を用いて特定条件で当該シートを製造するもののある点で、それらの明示のない後者と相違する。しかしながら、本発明者の澤、竹谷、宮川らの文献 1, Suzuki らの文献 6 に示されるように、骨格筋芽細胞の適用により虚血性心疾患や拡張型心筋症のような心機能不全を治療可能であることは当業者にとり公知であるし、清水らの文献 2, 岡野らの文献 3 に示されるように、心臓に適用可能な三次元構造体の製造方法として、本願請求項 8 に特定されるような手法を採用することも当業者によく知られていたものと認められる。そして、上記述べたように、このようにして作成された細胞シートは、「収縮した」細胞シートであることが明らかである（文献 8-10）。してみると、上記文献の記載に接した当業者であれば、文献 4 記載の心筋再生作用を有する骨格筋芽細胞シートを虚血性心疾患や拡張型心筋症に適用してみること、及び、細胞シートの製造方法として公知のもの（文献 2, 3）を採用し、上記請求項に係る発明に想到することは、当業者が通常になし得た事項であると認められる。また、細胞の由来や併用薬剤、シート厚み等は当業者が適宜設定すべき事項である。そして、これらの事項による格別の効果も認められない。
（iii） 宮川らの文献 5（人工臓器, 2002 年, Vol.31, No.1, pp.25-26）には、ポリイソプロピルアクリルアミドが被覆された温度感応性応答培養皿を用いて作成された心筋細胞シートを梗塞心に移植したところ、心機能の向上を認めた

こと、拡張型心筋症等も治療できる可能性を秘めていることが記載されている。ここで、当該細胞シートは、「収縮した」細胞シートであると認められる（文献8-10)。上記請求項に係る発明と文献5記載の発明とを対比すると、前者は骨格筋芽細胞を用いるものである点で、その明示のない後者と相違する。しかしながら、文献1, 4, 6, 7（宮川らの文献7：第6回日本組織工学会抄録集, 2003年6月, p.50）に示されるように、骨格筋芽細胞が心筋再生効果を有すること（文献1, 4, 7)、筋芽細胞シートが心筋細胞シートと同様に心機能改善作用を有すること（文献7)、骨格筋芽細胞自体が拡張型心筋症の治療に用いられ得ること（文献6）等は当業者にとり公知であるから、文献5に記載の心筋細胞に代えて骨格筋芽細胞を用いて作成した細胞シートについても、虚血性心疾患や拡張型心筋症の治療効果を期待してみることは、当業者が通常に想起し得る事項である。また、細胞シートの製造方法についても、文献2, 3に示されたような方法を採用することも当業者が適宜なし得る事項である。そして、これらの事項による格別の効果も認められない。

(iv)　Suzukiらの文献6には、骨格筋芽細胞が拡張型心筋症のような心機能不全の治療においても用いられ得ることが記載されている。そして、Ahmadらの文献4に示されるように、骨格筋芽細胞を用いた心機能再生において、当該細胞の直接投与には制約があり、代替的な手法が求められていたところ、組織工学的に作成された細胞シートとしたことが記載されている。してみれば、文献6記載の骨格筋芽細胞を拡張型心筋症の治療に用いる際に、文献4に示されたように、骨格筋芽細胞のシートとしたものとしてみることは、当業者が通常に想起し得る事項である。また、細胞シートの製造方法についても、文献2, 3に示されたような方法を採用することも当業者が適宜なし得る事項であり、このようにして得られた細胞シートは、「収縮した」細胞シートであるとも認められる（文献8-10)。そして、これらの事項による格別の効果も認められない。

　これに対し、出願人は2012年8月27日に以下のように応答した。

理由1：　本件明細書は、例えば、「本発明の人工組織、三次元構造体を構成する細胞としては、例えば、上述の外胚葉、中胚葉及び内胚葉に由来する分化細胞又は幹細胞が使用され得る。･･･ある実施形態では、このような細胞として、筋芽細胞（例えば、骨格筋芽細胞など)、･･･などが使用され得る。」(段落0022）と記載している。そして、本件明細書は、例えば、段落0160において、「本発明の人工組織生産法では、培養した工程に続き、D）人工組織を剥離させ自己収縮させる工程、をさらに含む。剥離は、物理的な刺激（例えば、容器の角に棒などで物理的刺激を与えるなど）を行うことによって促進することができる。温度応答性高分子を用いる場合、その臨界溶解温度よりも高い又は低い温度に

環境を操作することによって、剥離を促進することができる。自己収縮は、このような剥離の後自然に起こる。」と記載（段落 0160）し、本件発明の三次元構造体に共通の性質として、細胞培養支持体からの剥離後の収縮を明記している。上記の記載に接した当業者は、骨格筋芽細胞を構成細胞とする本件発明の三次元構造体は、細胞培養支持体から剥離された後に収縮することを理解すると思料する。従って、補正後の請求項 1 は、新規事項は追加されておらず、当該拒絶理由には該当しない。同様の理由により、補正後の請求項 8 についても、当該拒絶理由には該当しないと思料する。
理由 2 及び 4：　今回の補正により、補正後の請求項 1 に記載された三次元構造体は、細胞培養支持体から剥離された後に、剥離前のものと比べて収縮するものとなった。上記学術集会には、細胞シートが細胞培養支持体から剥離された後に収縮することは記載されていない。また、岡野らの文献 8、及び、大和らの文献 9 は、どのような細胞を構成細胞とする細胞シートが収縮するのか記載していないし、Hirose らの文献 10 は、ヒトの大動脈内皮細胞（HAEC)の細胞シートが収縮することを記載しているに過ぎない。このような文献の記載から、骨格筋芽細胞を構成細胞とする三次元構造体の性質にまで一般化することはできない。従って、補正後の請求項 1 に記載された発明は、上記学術集会に記載された発明には該当しない。骨格筋芽細胞を構成細胞とする三次元構造体が収縮することを示唆する記載は、上記学術集会や文献 8～10 には見当たらない。従って、これらの文献に基づいたとしても、補正後の請求項 1 に記載された発明特定要件の全てに到達することは困難であると思料する。そして、本件明細書の実施例 3 には、骨格筋芽細胞を構成細胞とする三次元構造体の効果に関し、「筋芽細胞シートを移植した後、拡張した左心室（ＬＶ）寸法が顕著に減少したことが、超音波エコー図（ＵＣＧ）によって示され、他方、Ｔ群及びＣ群の心臓は、左心室（ＬＶ）拡張の進行を示した（図３３Ａ）」、「ＤＣＭハムスターは、サルコグリカンの発現が減少することによって一部拡張型心筋症の症状を呈することが知られているが、本発明の三次元組織構造体によって、そのような遺伝子発現も補充する効果があることが明らかになった。」、「また、図３３Ｂから明らかなように、本発明の三次元組織構造体を用いた場合に、４８週を超えてＤＣＭハムスターが生存していた。これは、・・・顕著な効果であり、全く予想外のことといえる。図３３Ｃに示すように、筋芽細胞三次元組織構造体の移植により拡張型心筋症の左室収縮能が顕著に改善した。・・・この顕著な改善は、人間に換算すると約２５年の寿命延長に該当し、本発明の三次元組織構造体の顕著な効果が心筋症において実証されたといえる。」と記載されている。また、本件明細書の実施例 4 は、ブタの心筋梗塞モデルに骨格筋芽細胞シートを移植し、心機能の収縮性及び拡張性が改善されたこと、心筋梗塞部分に移植された

細胞が生着したことを示している。上記のような、左心室の拡張を抑制すること、サルコグリカンの遺伝子発現の補充、移植による極めて長い延命効果等は、上記学術集会の資料には記載や示唆されていない。骨格筋芽細胞を構成細胞とする三次元構造体の効果について、文献 8〜10 は記載や示唆していない。更に、よりヒトに近い大型動物モデルであるブタにおいて心機能を回復させることが可能であり、ヒトへの適用可能性が強く示唆されたことも全く予想できない。従って、補正後の請求項 1 に記載された発明は顕著な効果を有し、当該効果を予測することは、上記学術集会の資料や文献 8〜10 の記載から予測することは困難である。以上の理由により、補正後の請求項 1 に記載された発明は、上記学術集会の資料や文献 8〜10 の記載に基づいて、容易に想到し得たものではないため、当該拒絶理由には該当しない。

理由 3 及び 4：　今回の補正により、補正後の請求項 1 においては、三次元構造体は細胞培養支持体から剥離された後に収縮することが明確に定義された。本発明者の澤、竹谷、宮川らの文献 1 には、細胞シートが収縮することについて、記載や示唆は見当たらない。Suzuki らの文献 6 は、バラバラの骨格筋芽細胞を注入することを記載しているが、当該細胞の細胞シートの移植効果は記載や示唆していない。従って、補正後の請求項 1 に係る発明は、文献 1，6 に記載された発明には該当しない。そして、このような文献 1，6 の記載に基づいたとしても、補正後の請求項 1 に記載された発明特定要件の全てに到達することは容易なことではない。さらに、補正後の請求項 1 に記載された発明は、顕著な効果を発揮する。このような効果は、文献 1，6 のいずれにも記載や示唆は見当たらないので、当業者といえども予測することは困難である。従って、補正後の請求項に記載の発明は、文献 1，6 に基づいて当業者が容易に想到し得ない。

〜10 の記載を、これらの文献に記載や示唆の一切見当たらない骨格筋芽細胞を構成細胞とする三次元構造体にまで一般化することはできない。従って、文献 1〜3，6，8〜10 の記載に基づいて、補正後の請求項 1 に記載された発明特定要件の全てに到達することは困難である。そして、補正後の請求項 1 に記載の発明は、上記のように、顕著な効果を有する。このような効果は、文献 1〜3，6，8〜10 の記載から予測することは困難である。また、補正後の請求項 1 に記載の発明は、文献 1〜3，4，6，8〜10 に基づいて当業者が容易に想到し得ないものであるため、当該拒絶理由には該当しないと思料する。また、文献 1〜6，8〜10 の記載を参照したとしても、補正後の請求項 1 に記載の発明特定要件の全てに到達することは容易なことではない。さらに、文献 2〜4，6，8〜10 の記載を参照したとしても、補正後の請求項 1 に記載の発明特定要件の全てに到達することは容易なことではない。

（４）その後

　最後の拒絶理由通知に対する対応後、新たな審査結果は通知されていない。現在の係属中の請求項は、2012 年 8 月 27 日に提出された手続補正書に記載された、次の 13 項である。なお、本件の最初の拒絶理由通知応答の際、出願当初の内容で分割出願がされているが、この孫出願については、その後の進展はない。

【請求項１】スキャフォルドを用いず、骨格筋芽細胞を構成細胞とする、細胞培養支持体から単離された、虚血性心疾患および拡張型心筋症からなる群から少なくとも１つ選ばれる心臓疾患に適用するための、収縮したシート状筋芽細胞三次元構造体であって、

　前記心疾患への適用は、前記シート状筋芽細胞三次元構造体の移植によって行い、

　前記収縮は、細胞培養支持体から剥離された後に起こる、前記シート状筋芽細胞三次元構造体。

【請求項２】骨格筋芽細胞は、前記シート状筋芽細胞三次元構造体が適用される被験体に由来する、請求項１に記載のシート状筋芽細胞三次元構造体。

【請求項３】複数の層の細胞シートを含む、請求項１または２に記載のシート状筋芽細胞三次元構造体。

【請求項４】前記三次元構造体の厚みが５０μｍ以上である、請求項１～３のいずれか１項に記載のシート状筋芽細胞三次元構造体。

【請求項５】前記三次元構造体が、ミオシン重鎖 IIa、ミオシン重鎖 IIｂ、ミオシン重鎖 IIｄ（IIｘ）、ＣＤ５６、ＭｙｏＤ、Ｍｙｆ５およびｍｙｏｇｅｎｉｎからなる群より選択される少なくとも１つの非成体心臓マーカーを発現する、請求項１～４のいずれか１項に記載のシート状筋芽細胞三次元構造体。

【請求項６】請求項１～５のいずれか１項に記載のシート状筋芽細胞三次元構造体を含む虚血性心疾患および拡張型心筋症からなる群から少なくとも１つ選ばれる心臓疾患に適用するための医薬。

【請求項７】サイトカインまたは増殖因子が併用される、請求項６に記載の医薬。

【請求項８】スキャフォルドを用いず、骨格筋芽細胞を構成細胞とする、虚血性心疾患および拡張型心筋症からなる群から少なくとも１つ選ばれる心臓疾患に適用するための、収縮したシート状筋芽細胞三次元構造体を製造する方法であって、

ａ）水に対する上限臨界溶解温度または下限臨界溶解温度が０～８０℃である温度応答性高分子が被覆された細胞培養支持体上で、骨格筋芽細胞を培養し、シート状筋芽細胞三次元構造体を形成する工程；

ｂ）培養液温度を、該上限臨界溶解温度以上または下限臨界溶解温度以下とす

る工程；
ｃ）シート状筋芽細胞三次元構造体を、細胞培養支持体から剥離する工程；および
ｄ）シート状筋芽細胞三次元構造体を収縮させる工程；
を包含し、
　前記心疾患への適用は、前記シート状筋芽細胞三次元構造体の移植によって行う、前記方法。
【請求項９】前記剥離前に、培地にアスコルビン酸またはその誘導体を加えることを特徴とする、請求項８に記載の方法。
【請求項１０】前記剥離時またはその前に、タンパク質分解酵素処理がなされない、請求項８または９に記載の方法。
【請求項１１】前記温度応答性高分子が、ポリ（Ｎ－イソプロピルアクリルアミド）である、請求項８～１０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１２】温度応答性高分子は、細胞培養支持体の表面全体に被覆される、請求項８～１１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１３】請求項８～１２のいずれか１項に記載の方法によって製造される、スキャフォルドを用いず、骨格筋芽細胞を構成細胞とする、虚血性心疾患および拡張型心筋症からなる群から少なくとも１つ選ばれる心臓疾患に適用するための、収縮したシート状筋芽細胞三次元構造体。

３－３－５　欧州出願の詳細：04707319.2
（１）拒絶理由に関する第１回目の庁指令、及び、これに対する出願人の応答
　2006 年 2 月 28 日にカルディオにより欧州への移行手続がとられた。国際調査機関として欧州特許庁が選定されているため、その後、更なるサーチレポートが発行されることなく拒絶理由に関する最初の庁指令が発行された。
①クレーム 24 は明確でない（84 条）。
②クレーム 1～6, 10, 11, 16, 17, 22, 23 は、米国 Diacrin 社の D1（US6432711）, D2（WO01/07568）, D3（Circulation, vol. 104, no. 17, pp. 2063-2068）に対する新規性がない（54 条(2)）。
③クレーム 18～21, 24～26 は D1 に Shimizu らの D4(Circulation research, vol. 90, No. 3, pp. e40-48), Okano の D5
（http://www.j-circ.or.jp/english/sessions/reports/66th-ss/okano.htm）
を組み合わせて進歩性がない（56 条）。
④クレーム 7 は、滑膜細胞を含む三次元構造体に関するものであるが、明細書には滑膜細胞に関する実施例がなく、結果としてクレーム 7 は明細書にサポートされていない（84 条）。

⑤クレーム8は、幹細胞に由来する細胞であればいかなる種類の細胞であってもよいとされているので、幹細胞に由来する細胞が何であるのか明確でない。
⑥クレーム12〜15は、骨格筋芽細胞を含む三次元構造体に関する。クレーム13-15に挙げられたマーカーは骨格筋芽細胞に発現される標準マーカーに対応するもののみである。AkramらのD6（US6407451）は多層構造を作り上げる筋芽細胞のロール状のシートからなる構造を含む三次元筋芽細胞が開示されている。D6の構造は心筋移植として使用されていないけれども、このアプローチがその結果に用い得ないと考える理由はない。したがって、クレーム1〜5, 11〜21はD6に対する新規性がない（EPC54条(2)）。
⑦クレーム9, 10は、細胞を含む構造が、それらが由来する被検体に適用される意図があるのかないのかにかかわらず、クレーム1の構造に加えられた構造がない。したがって、クレーム9,10はD1〜D3, D6に対する新規性がない（EPC54条(2)）。
⑦クレーム24〜26に関しては、進歩性の査定に関してShimizuらのD7(J. Artif. Organs, 2002, 5, pp.216-222) は最も近い先行技術ともとらえられる。D7は筋芽細胞が、他の細胞の中で、梗塞した心臓を再生する潜在力、及び、温度応答性PIPAAmの使用により、損傷がない細胞シートが得られ、酵素的分解を使用せずに細胞を修復できることを開示する。PIPAAm基材を筋芽細胞と共に使用することは開示されていないが、D7に接し、損傷がない心筋を再生するため心筋細胞に代えて筋顧細胞を使用する利点を知った当業者であれば、PIPAAm上で筋芽細胞を成長することを強く促される。したがって、クレーム24〜26の主題は、D7に対する進歩性を有しない（EPC56条）。

その後、出願人名義が㈱カルディオから㈱セルシードに変わり、庁期限の延長申請がとられたが、延長後の庁期限を経過しても応答されていないため、取下げ通知がなされた。しかし、2008年6月26日に応答がなされ、更なる審査を請求したところ、2008年8月8日付で、かかる請求を受理する旨の庁通知がなされた。㈱セルシードの応答は、以下の通りのものである。
①新規性について：
・クレーム1, 24について、「スキャフォルドを用いず、」という点が特定された。これにより、米国Diacrin社のD1,2, KellarらのD3に対する新規性欠如の拒絶理由は解消した。
・AkramらのD6については、審査官も言及するように、D6の構造は心筋移植として使用されていない。その上、D6は哺乳類の筋肉が合成的なマトリックスを用いて構築されることをを開示する。したがって、補正後の主題は、D6に対しても新規である。

②進歩性について：いずれの文献も、スキャフォルドを用いず、心臓に適用可能で、成人の心筋以外の部分に由来する細胞を含む三次元構造体を開示しない。米国Diacrin社のD1は心臓に適用可能な三次元構造体を開示しない。その上、スキャフォルドを用いず、D1は心臓に適用可能な三次元構造体を開示しない。したがって、当業者は、ShimizuらのD4, OkanoらのD5を組み合わせようとしない。本明細書には、以下のことが記載されている。

「心臓に適用可能な三次元構造体は、従来成体の心筋由来の細胞で小型で性能の悪いものが提供されていた。」（68頁, 21-24行）

「筋芽細胞を用いた三次元構造体が心臓において適用可能であることは、従来予測不可能であったことであり、」（69頁, 27-29）

したがって、われわれは、本願優先日には、技術的に否定的な考えが明らかに存在していたことを提示している。本発明は、予期せずに、この否定的な考えを克服できたものである。等に、心筋以外の部分に由来する細胞（例えば筋芽細胞）は豊富な自己の細胞である。それは本明細書に記載されている（71頁, 12-13行）。

「自己細胞を用いることによって、免疫拒絶反応を防ぐか又は低減することができる。」

心筋以外の自己の起源由来の組織を得ることは望ましい。したがって、補正後の主題は、進歩性を有する。

③サポート要件について：審査部は、クレームの主題が明細書にサポートされていないとするが、実施例5には滑膜細胞を使用して心臓機能がよくなることが示されている。

④明確性について：クレーム8の主題はクレーム1の三次元構造体が幹細胞に由来することを特定するものである。幹細胞は胚性幹細胞及び組織幹細胞に分類される。幹細胞の詳細な説明、及び、本発明に用いられるべき組織幹細胞の実施例は明細書に記載されている。これらの組織幹細胞のいかなるものも本発明を実行するために用いられ得る。重要な主題は、心筋に対する障害を治すためそのような細胞を用いることによって三次元構造体が形成されることである。クレーム24については、高分子膜を具体的な種類をマーカッシュ形式で記載する補正をすることによって、明確になった。

（２）拒絶理由に関する第２回目の庁指令、及び、これに対する出願人の応答

代理人変更手続が取られた後、2010年2月25日付で庁指令が通知された。この庁指令では、本発明で開示された主題が、本願優先前の2003年3月28日付け第67回日本循環器学会年次学術集会における発表に開示されているので、審査官が本願の特許性を評価できるように、この発表の内容を審査官に伝えるこ

と、及び、その開示がEPO言語でないならば、EPO言語による翻訳が求められることが通知された。

　これに対し、㈱セルシードは、応答期限の延長手続を取った後、2010年9月7日に審査官の求める資料を提出するとともに、補正書及び意見書を提出した。補正書では、クレーム1〜21の三次元構造体、及び、クレーム22〜23の医薬に係るクレームが削除され、クレーム24の三次元構造体を製造する方法のクレームが第1請求項となった。クレーム24は更に、ヒトに用いられ、かつ、ヒトの骨格筋芽細胞においてCD56が少なくとも50%発現している三次元構造体に限定すること、細胞がヒトの筋芽細胞に由来すること、三次元構造体のCD56を検出するステップを導入することによって補正された。また、補正前のクレーム9〜14に対応する三次元構造体のクレームが、クレーム4〜19に追加された。そして、意見書では、補正後の発明は、第67回日本循環器学会年次学術集会において発表されたものではないことが主張された。

（３）拒絶理由に関する第３回目の庁指令、及び、これに対する出願人の応答

　2011年6月28日付で、下記の内容の庁指令が通知された。

①補正違反:「CD56を検出するステップを導入すること」を追加する補正は、新規事項を追加するものである。

②新規性及び進歩性:

・2003年3月28日付け第67回日本循環器学会年次学術集会におけるMemonらの発表では、骨格筋から筋芽細胞を単離するステップと、ポリ（Ｎ−イソプロピルアクリルアミド）でコートした皿上で筋芽細胞を培養するステップとを含む三次元構造細胞シートを調製することを開示する。細胞シートは20℃に温度を下げた後に剥離され、二層シートが移植に用いられている。この発表では、単離後、又は細胞シート内の筋芽細胞におけるCD56発現を減給しないが、発明者自身の宣誓には、三次元構造体は本発明の方法によって製造された三次元構造体が確かにヒト骨格筋芽細胞と比較して50%を超えるCD56を発現するとある。CD56発現はつまり本発明によって製造される細胞シートに内在する特徴である。したがって、本発明の方法、又はその方法によって得られる細胞シートと、上記発表で開示されるものとの間に相違はない。

出願人は上記の発表で開示される方法は、ヒト移植には適切でないことを主張するが、ヒト移植の製造であるかどうかの開示は本明細書にはないから、その場合は記載不備の拒絶理由が生じる。

・「CD56を検出するステップを導入すること」を追加する補正がかりに補正違反に該当しない場合も、進歩性を有しない。ManascheらのD13（Lancet, 2001, col. 357, no. 9252, pp.279-280）には筋芽細胞の移植が心臓の損傷を治療すること、

調製の純度がCD56発現の検出によって評価されることを開示する。当該技術分野においてCD56は、筋芽細胞を確認することに用いられる自明な代替可能なマーカーである。
③明確性及びサポート：クレーム１の「ヒトの骨格筋芽細胞においてCD56が少なくとも50%発現している」、クレーム8, 10の「構造体中の非成体心筋マーカーの発現レベルはヒト骨格筋細胞中の非成体心筋マーカーの発現レベルの少なくとも50%である」との記載は明確でない。マーカーの発現レベルは骨格筋細胞の発現レベルに比較して評価されるべきであることを意味される。これはすべての筋芽細胞が一定のレベルで特定のマーカーを発現すると仮定した場合であるが、これはそのケースではない。クレームで与えられる発現レベルの定義により、どのような細胞がクレームのスコープにあたるのか、当業者は理解することができない。上記発表及びD13から移植前に評価されるものが発現レベルよりもむしろCD56を発現する細胞の数であるようにみえる。

これに対し、庁期限の延長手続が取られた後、2012年1月9日付で、応答がされた。補正によりCD56に関する構成が削除され、拡張性肥大型心筋症又は虚血性心臓病を治療するためヒトの心臓に移植されるための三次元構造体の製造方法に改められた。そして、この補正により拒絶理由が解消された旨の主張がなされた。

（４）その後～現在

新たな審査結果は、出ていない。また、2010年9月30日付で2つの分割出願がなされており、この分割出願については、2011年8月11日付でサーチレポートが発行され、これに応答して2012年3月14日付でクレーム補正がなされている。現在係属中のクレームは、下記のとおりである。
①本願クレーム（04707319.2）
1.　A method for producing a three-dimensional structure for implanting into a heart of a human to treat dilated phase hypertrophic cardiomyophthy or ischemic heart disease, in which a scaffold is not used, and which comprises a cell derived from a part other than myocardium of an adult,
　the method comprising the steps of:
　a) culturing the cell derived from the part other than myocardium of an adult on a cell culture support grafted with a temperature responsive macromolecule having an upper limit critical solution temperature or lower limit critical solution temperature to water of from 0° C to 80° C, wherein the temperature responsive macromolecule is selected from the group

consisting of poly (N-isopropylacrylamide), poly (N-isopropylacrylamide-acrylic acid) copolymer, poly (N-isopropylacrylamidemethylmethacrylate) copolymer, poly (N-isopropylacrylamide-sodium acrylate) copolymer, poly (N-isopropylacrylamide-vinyl ferrocene) copolymer, gannma-ray-exposed poly (vinylmethylether) (PVME), poly(oxyethylene), and a gel obtained by cross-linking the above-described macromolecules with a cross-linking agent;

b) setting a culture medium temperature to the upper limit critical solution temperature or more or the lower limit critical solution temperature or less; and

c) detaching the cultured cell as a three-dimensional structure.

2. A method according to claim 1, wherein a treatment using a protein degrading enzyme is not performed in or before the detaching step .

3. A method according to claim 24, wherein the temperature responsive macromolecule is poly(N-isopropylacrylamide) .

4. A three-dimensional structure for use in a method of implanting into a heart of human to treat dilated phase hypertrophic cardiomyopathy or ischemic heart disease, which is produced by the method according to any one of claims 1 to 3.

5. The structure according to claim 4, wherein the structure is produced by culturing the cell derived from a subject by the method according to any one of claims 1 to 3 and is suitable to be applied to the subject.

6. The structure according to claim 4, wherein the structure is produced by culturing the cell not derived from a subject by the method according to any one of claims 1 to 3 and is suitable to be applied to the subject.

7. The structure according to claim 4, wherein the structure expresses at least one non-adult heart marker selected from the group consisting of myosin heavy chain IIa, myosin heavy chain lib, myosin heavy chain I I d(IIx), CD56, MyoD, Myf5, and myogenin .

8. The structure according to claim 4, wherein the three-dimensional structure expresses all of myosin heavy chain IIa, myosin heavy σhain lib, myosin heavy chain IId(IIx) , CD56, MyoD, Myf5, and myogenin.

9. The structure according to claim 8 , wherein an expression level

of each of myosin heavy chain IIa, myosin heavy chain lib, myosin heavy chain I I d(IIx), CD56, MyoD, Myf5, and myogenin in the structure is at least about 100% of an expression level thereof in skeletal myoblasts of a human.

10. The structure according to claim 4, wherein the cell derived from a part other than myocardium is a cell not derived from heart.

11. The structure according to claim 4, wherein the applicability to heart includes applicability to myocardium.

12. The structure according to claim 4, comprising a monolayer cell sheet.

13. The structure according to claim 4, comprising a multilayer cell sheet.

14. The structure according to claim 13, wherein the multilayer cell sheet has biological connection.

15. The structure according to claim 14, wherein the biological connection is selected from the group consisting of connection via extracellular matrix, electrical connection, and connection without scaffold.

16. A medicament for use in a method of treating dilated phase hypertrophic cardiomyopathy or ischemic heart disease, comprising a three-dimensional structure according to any one of claims 4 to 15.

②分割クレーム（10183361.4）

1. A three-dimensional structure for use in a method of implanting into a heart of human to treat dilated phase hypertrophic cardiomyopathy or ischemic heart disease, comprising a cell derived from a part other than myocardium of an adult,

wherein the three-dimensional structure is free from a scaffold, and has at least 6 cm^2 area and at least 50 um thickness,

wherein the three-dimensional structure shrinks when being detached from an cell culture support, and

wherein the cell is a myoblast.

2. A structure according to claim 1, wherein the myoblast is a skeletal myoblast.

3. The structure according to claim 1, wherein the cell is derived from a subject, the structure being applied to the subject.

4. The structure according to claim 1, wherein the cell is not derived

from a subject, the structure being applied to the subject.

5. The structure according to claim 1, wherein the structure expresses at least one non-adult heart marker selected from the group consisting of myosin heavy chain IIa, myosin heavy chain IIb, myosin heavy chain IId(IIx), CD56, MyoD, Myf5, and myogenin .

6. The structure according to claim 11, wherein an expression level of the non-adult heart marker in the structure is at least 50% of an expression level of the non-adult heart marker in skeletal myoblasts.

7. The structure according to claim 1, wherein the three-dimensional structure expresses all of myosin heavy chain IIa, myosin heavy σhain IIb, myosin heavy chain IId(IIx) , CD56, MyoD, Myf5, and myogenin.

8. The structure according to claim 6, wherein an expression level of each of myosin heavy chain IIa, myosin heavy chain IIb, myosin heavy chain IId(IIx), CD56, MyoD, Myf5, and myogenin in the structure is at least about 50% of an expression level thereof in skeletal myoblasts.

9. The structure according to claim 6 , wherein an expression level of each of myosin heavy chain IIa, myosin heavy chain IIb, myosin heavy chain IId(IIx), CD56, MyoD, Myf5, and myogenin in the structure is at least about 100% of an expression level thereof in skeletal myoblasts.

10. The structure according to claim 1, wherein the cell derived from a part other than myocardium is a cell not derived from heart.

11. The structure according to claim 1, wherein the heart includes myocardium.

12. The structure according to claim 1, comprising a monolayer cell sheet.

13. The structure according to claim 1, comprising a multilayer cell sheet.

14. The structure according to claim 12, wherein the multilayer cell sheet has biological connection.

15. The structure according to claim 13, wherein the biological connection is selected from the group consisting of connection via extracellular matrix, electrical connection, and connection without scaffold.

16. A medicament, comprising a three-dimensional structure according to any one of claims 1 to 15.

17. The medicament according to claim 16, for use in a method for

treating dilated phase hypertrophic cardiomyopathy or ischemic heart disease.

18. A method for producing a three-dimensional structure applicable to heart of a human to treat dilated phase hypertrophic cardiomyopathy or ischemic heart disease, in which a scaffold is not used, which shrinks and has at least 6 cm^2 area and at least 50 um thickness, and which comprises a cell derived from a part other than myocardium of an adult, wherein the cell is a myoblast, and

the method comprising the steps of:

a) culturing the cell derived from the part other than myocardium of an adult on a cell culture support grafted with a temperature responsive macromolecule having an upper limit critical solution temperature or lower limit critical solution temperature to water of from 0° C to 80° C, wherein the cell is a myoblast and the temperature responsive macromolecule is poly (N-isopropylacrylamide);

b) setting a culture medium temperature to the upper limit critical solution temperature or more or the lower limit critical solution temperature or less; and

c) detaching the cultured cell as a three-dimensional structure.

19. The method according to claim 18, wherein the culture medium temperature in b) is set to 20° C to lower limit critical solution temperature to water.

20. The method according to claim 19, wherein ascorbic acid or a derivative thereof is added before the detaching step.

21. The method according to claim 18 or 19, wherein a treatment using a protein degrading enzyme is not performed in or before the detaching step.

③分割クレーム（10183373.9）

1. A three-dimensional structure applicable to heart, comprising a cell derived from a part other than myocardium of an adult,

wherein the three-dimensional structure is free from a scaffold, and

wherein the cell is selected from the group consisting of a mesenchymal stem cell, a synovial cell, and an embryonic stem cell.

2. The structure according to claim 1, wherein the cell is derived from a subject, the structure being applied to the subject.

3. The structure according to claim 1, wherein the cell is not derived from a subject, the structure being applied to the subject.
4. The structure according to claim 1, wherein the structure expresses at least one non-adult heart marker selected from the group consisting of myosin heavy chain IIa, myosin heavy chain lib, myosin heavy chain I I d(IIx), CD56, MyoD, Myf5, and myogenin .
5. The structure according to claim 114, wherein an expression level of the non-adult heart marker in the structure is at least 50% of an expression level of the non-adult heart marker in skeletal myoblasts.
6. The structure according to claim 1, wherein the three-dimensional structure expresses all of myosin heavy chain IIa, myosin heavy σhain lib, myosin heavy chain IId(IIx) , CD56, MyoD, Myf5, and myogenin.
7. The structure according to claim 6, wherein an expression level of each of myosin heavy chain IIa, myosin heavy chain lib, myosin heavy chain I I d(IIx), CD56, MyoD, Myf5, and myogenin in the structure is at least about 50% of an expression level thereof in skeletal myoblasts.
8. The structure according to claim 6, wherein an expression level of each of myosin heavy chain IIa, myosin heavy chain lib, myosin heavy chain I I d(IIx), CD56, MyoD, Myf5, and myogenin in the structure is at least about 100% of an expression level thereof in skeletal myoblasts.
9. The structure according to claim 1, wherein the cell derived from a part other than myocardium is a cell not derived from heart .
10. The structure according to claim 1, wherein the applicability to heart includes applicability to myocardium.
11. The structure according to claim 1, comprising a monolayer cell sheet.
12. The structure according to claim 1, comprising a multilayer cell sheet.
13. The structure according to claim 12, wherein the multilayer cell sheet has biological connection.
14. The structure according to claim 13, wherein the biological connection is selected from the group consisting of connection via extracellular matrix, electrical connection, and connection without scaffold.
15. The structure according to any one of claims 12 to 14, wherein the multilayer cell sheet comprises a cell sheet of a myoblast.

16.　　The structure according to claim 15, wherein the myoblast is a skeletal myoblast.
17.　　The medicament, comprising a three-dimensional structure according to any one of claims 1 to 16.
18.　　The medicament according to claim 17, wherein the heart has a disease or disorder selected from the group consisting of heart failure, ischemic heart disease , myocardial infarct , cardiomyopathy, myocarditis, hypertrophic cardiomyopathy, dilated phase hypertrophic cardiomyopathy, and dilated cardiomyopathy.
19.　　A method for producing a three-dimensional structure applicable to heart comprising a cell derived from a part other than myocardium of an adult, wherein the cell is selected from the group consisting of a mesenchymal stem cell, a synovial cell, and an embryonic stem cell, and the method comprising the steps of:

a) culturing the cell derived from the part other than myocardium of an adult on a cell culture support grafted with a temperature responsive macromolecule having an upper limit critical solution temperature or lower limit critical solution temperature to water of from 0° C to 80° C, wherein the cell is selected from the group consisting of a mesenchymal stem cell, a synovial cell, and an embryonic stem cell;

b) setting a culture medium temperature to the upper limit critical solution temperature or more or the lower limit critical solution temperature or less; and

c) detaching the cultured cell as a three-dimensional structure.

20.　　The method according to claim 19, wherein ascorbic acid or a derivative thereof is added before the detaching step.
21.　　The method according to claim 19 or 20, wherein a treatment using a protein degrading enzyme is not performed in or before the detaching step .
22.　　The method according to claim 19 or 20, wherein the temperature responsive macromolecule is poly(N-isopropylacrylamide) .

３－３－６　米国出願の詳細：04/567728

（１）限定要求、及び、これに対する出願人の応答

2006 年 1 月 31 日付けに移行手続が取られた後、2009 年 3 月 30 日付けて限定要求がなされた。

グループⅠ（クレーム 1-5, 8-23）：非心筋幹細胞を含む、心臓に適用可能な

三次元構造体、及び、その構造体の製造法、又は、
　グループⅡ（クレーム1, 2, 6-10, 16-26）: 非心筋の様々な細胞を含む、心臓に適用可能な三次元構造体、及び、その構造体の製造法
　のいずれかを選択せよ、という指令である。
　これに対し、出願人は、グループⅠを選択するとの応答をした。

（２）最初のオフィスアクション、及び、これに対する出願人の応答
　2009年7月14日に最初のオフィスアクションが発行された。限定要求に基づきクレーム1-5, 8-23が審査対象となり、米国Diacrin社のWO01/07568, 米国ミシガン大学のUS6207451に対する新規性がない（102条(b)）、との理由で全クレームが拒絶された。

　これに対し、3ヶ月応答期限を延長した後、2010年1月14日に出願人は以下のように応答した。
　補正により「スキャフォルドなく生物的結合を有する細胞シートを有する」ことにとって限定した。クレーム23の医薬は「心臓を治療するために用いられるクレーム1の構造体」とした。クレーム27, 28に、クレーム23を引用する治療方法に係るクレームを追加した。クレーム17, 22は削除した。そして、この補正後のクレームは、文献に対する新規性を有する旨を主張した。

（３）ファイナルオフィスアクション、及び、これに対する出願人の応答
　2010年4月15日にファイナルオフィスアクションが発行された。このオフィスアクションでは、以下の拒絶理由が指摘されている。
①新規性欠如の拒絶理由は維持される。
　米国Diacrin社のWO01/07568は、ポリL-リシンでコートされた基材上で培養された移植可能な骨格筋芽細胞及び繊維芽細胞を製造する方法を教示する（2頁, 18-24行）。筋芽細胞及び繊維芽細胞はクレーム8で要求される能幹細胞に由来する細胞である。筋芽細胞は、成人の非心筋組織（骨格筋生検）に由来し、犬に適用され、クレーム10の限定を満たす。同系の移植はクレーム9の限定を満たす。骨格筋細胞はmyogenin, MyoD及びMyf5を含むマーカーを内在的に発現する（Carnacら、Mol. Biol. Cell., 9, 1891-1902参照）。CD56及びミオシン鎖遺伝子はまた筋芽細胞において内在的に発現される（クレーム13）。細胞は骨格筋芽細胞であるから、マーカーは, クレーム12, 14, 15で要求される、少なくとも50%のレベル、骨格筋細胞の100%のレベルで発現する。出願人はWO01/07568で開示される技術は、本願明細書の段落0007で言及される「細胞移植」であり、その技術の欠点に関して議論されるが、本発明はそのような欠点

が存在しないことを主張する。しかし、WO01/07568は心臓に移植可能な筋芽細胞のシートを教示する。細胞層は細胞間の接続を有し、細胞はスキャフォルドに組み込まれていない。出願人はクレームされた構造と、当該技術の差異をはっきり示すことが求められる。

米国ミシガン大学のUS6207451はロール状の筋芽細胞シートからなる構造を含む三次元構造の筋芽細胞を教示する（カラム6-7)。筋芽細胞及び繊維芽細胞はクレーム8で要求される能幹細胞由来の細胞である。筋芽細胞はラッちトの非心筋細胞組織（肢骨格筋）に由来する（カラム6)。骨格筋芽細胞はmyogenin, MyoD及びMyf5を含むマーカーを内在的に発現する（Carnacら参照)。CD56及びミオシン鎖遺伝子も筋芽細胞において内在的に発現する（クレーム13)。細胞は骨格筋芽細胞であるので、クレーム12, 14, 15で要求されるように、マーカーは少なくと50%のレベル, 骨格筋細胞中では100%のレベルで発現する。出願人は、US6207451には、スキャフォルドなく生物的な接続を有する細胞シートを有する、成人の心筋以外に由来する細胞を備えた、心臓に適用可能な三次元構造体を開示しないと主張するが、クレームの限定がUS6207451に教示されていないことを具体的に示していない。したがって、どのクレームの限定がUS6207451に適合しないのかが明確でない。

②クレーム27, 28は, 実施可能要件を満たさない（112条第1パラグラフ)。また, 米国Diacrin社のWO01/07568にJinら（Jour Pharm and Exp Therapeutics, 02/01/2003, 304, 654-660）を組み合わせて自明である。

これに対し、2010年12月13日付で出願人は、クレーム補正とともにRCEを請求した。

補正においては、細胞が胚性幹細胞、間葉幹細胞、造血幹細胞、血管幹細胞又は滑膜細胞であり、三次元構造体がクレーム24に記載されたステップa)～c)の方法で得られることに限定された。また、クレーム27については、治療すべき疾患が、明細書に記載された具体的な疾患に特定された。細胞の限定がクレーム1に取り込まれたことにより、クレーム2～8は削除された。また、クレーム17, 22も削除された。そして、この補正により、拒絶理由は解消した旨の主張がなされた。

（４）2回目のノンファイナルオフィスアクション、及び、これに対する出願人の応答

2011年6月16日、non-final オフィスアクションが発行された。

①クレーム27, 28の実施可能要件違反が維持されるとともに、クレーム1, 9-16, 18-21,23についても実施可能要件が指摘された)(112条第1パラグラフ違反)。

明細書に記載されているのは、クレームにおいて特定された細胞及び対象疾患の一部であり、これらのすべてを実施できるようには明細書に記載されていないことが指摘された。
②クレーム１の構成の一部の記載、及び、クレーム 11－15 の内容が不明確である旨の拒絶理由がなされた（112 条第 2 パラグラフ違反）。
③新規性及び自明性の拒絶理由に関しては、補正によって解消した旨が示された。

　これに対し、2011 年 12 月 16 日にアピールが請求され（おそらく応答期間の時間稼ぎと思われる）、2012 年 7 月 16 日にクレーム補正とともに RCE が申請され、現在に至っている。クレームでは、構造体の構成細胞から「造血幹細胞、血管幹細胞」が削除された。また、治療方法クレーム等において、治療する対象疾患が「虚血性心臓疾患、心筋梗塞又は拡張型心筋症」に限定された。さらに、クレーム１では、オフィスアクションで不明確とされた構成を明確にする補正がなされクレーム 11～15 は削除された。

（５）その後～現在
　2 回目の RCE 後の審査結果は出ておらず、現在に至る。現在係属中のクレームは以下のとおりである。
1. (Currently Amended)　　A three-dimensional structure applicable to heart, comprising a cell derived from a part other than myocardium of an adult

wherein:

the cell is an embryonic stem cell, a mesenchymal stem cell, induced pluripotent stem cells, or synovial cells;

the synovial cells derives from internal surface of the joint and contains stem cells; and

the three-dimensional structure comprises a cell sheet having biological connection between cell sheets, is free from scaffold, and is obtained by the process comprising:

a) culturing the cell derived from the part other than myocardium of an adult on a cell culture support grafted with a temperature responsive macromolecule having an upper limit critical solution temperature or lower limit critical solution temperature to in an aqueous solution of from 0° C to 80° C;

b) setting a culture medium temperature to the upper limit critical

solution temperature or more or the lower limit critical solution temperature or less; and

c) detaching the cultured cell as a three-dimensional structure.

2-8. (Cancelled)

9. (Previously Presented) The structure according to claim 1, wherein the cell is derived from a subject, the structure being applied to the subject.

10. (Previously Presented) The structure according to claim 1, wherein the cell is not derived from a subject, the structure being applied to the subject.

11-15. (Canceled)

16. (Previously Presented) The structure according to claim 1, wherein the cell derived from a part other than myocardium is a cell not derived from heart .

17. (Canceled)

18. (Previously Presented) The structure according to claim 1, comprising a monolayer cell sheet.

19. (Previously Presented) The structure according to claim 1, comprising a multilayer cell sheet.

20. (Previously Presented) The structure according to claim 19, wherein the multilayer cell sheet has biological connection between cell sheets.

21. (Previously Presented) The structure according to claim 20, wherein the biological connection is selected from the group consisting of connection via extracellular matrix, electrical connection, and connection without scaffold.

22. (Canceled)

23. (Currently Amended) A medicament according to claim 1, which is used for treatment of a heart and wherein the heart has a disease or disorder selected from the group consisting of ischemic heart disease, myocardial infarct , and dilated cardiomyopathy.

24. (Withdrawn) A method for producing a three-dimensional structure applicable to heart comprising a cell derived from a part other than myocardium of an adult, the method comprising the steps of:

a) culturing the cell derived from the part other than myocardium of an adult on a cell culture support grafted with a temperature responsive macromolecule having an upper limit critical solution temperature or lower

limit critical solution temperature to water of from 0° C to 80° C;

b) setting a culture medium temperature to the upper limit critical solution temperature or more or the lower limit critical solution temperature or less; and

c) detaching the cultured cell as a three-dimensional structure.

25. (Withdrawn) A method according to claim 24, wherein a treatment using a protein degrading enzyme is not performed in or before the detaching step .

26. (Withdrawn) A method according to claim 24, wherein the temperature responsive macromolecule is poly(N-isopropylacrylamide) .

27. (Currently Amended) A method or treating the disease or disorder selected from the group consisting of ischemic heart disease, myocardial infarct, and dilated cardiomyopathy, which comprises the steps of disposing the three-dimensional structure according to claim 1 to cover a portion of a heart to be treated and holding the structure for a time sufficient to the portion.

28. (Previously Presented) The method according to claim 27, wherein a surface of the heart is treated with HGF.

３－３－７　考察

（１）新規性喪失の例外

本願の優先権の基礎となる出願（特願 2003-285476）は、2003 年 3 月 28 日に第 67 回日本循環器学会年次学術集会における発表について新規性喪失の例外の適用を受けて、2003 年 8 月 1 日（発表から 6 月以内）に出願されている。優先権主張による出願（PCT/JP2004/001034）が、2004 年 2 月 2 日（発表から 1 年以内）に英語によりなされている理由は、米国におけるグレースピリオド及び後願排除効を得るためと推測される。

したがって、米国においては、当該発表は先行技術として引用されていない。

一方、欧州においては、法制度上、当該発表による新規性喪失の例外の適用は受けられないため、当該発表との差別化に苦労しているようである。

日本においては、当該発表は、適切な手続をふめば、新規性喪失の例外の適用が受けられるはずであった。しかし、特許法 184 条の 14 に基づく新規性喪失の例外の特例を受けるものの証明書において特許を受ける権利の承継に関する説明の不備があったため、結局は例外適用を受けられなかった。また、本発明者を含む研究グループは、学会発表後、基礎出願の前において、雑誌発表をしており、この雑誌が、日本出願の引用文献として引用されている。本来、この

雑誌における発表についても新規性喪失の例外の適用も受けるべきであった。
　学会及び雑誌においては骨格筋細胞を有する構造体が発表されているが、日本の特許クレームからは骨格筋細胞の構成は削除されており、分割出願により権利化が図られている。この後、どのように発表内容と差別化していくのか行方が見守られる。

（２）日米欧の審査の比較
　新規性喪失の例外の適用が受けられるか否かで、日欧と、米との間に拒絶理由の内容に違いがみられた。
　しかし、米国特許商標庁の引用文献は、新規性喪失の例外適用に係る発表を除けば、日欧の結果と差異はなかった。例えば、米国の文献 WO01/07568 は、欧州国際調査機関で引用されたものであり、日本特許庁もこれを引用文献とする。また、米国で引用された文献 US6207451（ミシガン大学）は欧州特許庁が引用文献としたものである。
　なお、米国及び欧州の審査の進行が日本に比較して時間がかかっているが、これは、米国及び欧州の応答手続において、出願人が、応答期限の延長を最大限取得していること、欧米の応答期限が日本に比べて比較的長いことが、欧米での審査手続が日本に比べてに後れが生じた理由の一つと考えられる。

３－４　まとめ
　本調査により、我が国の細胞シート工学に基づく心臓再生医療の特許戦略は、日米欧において、積極的に展開されていることがわかった。しかしながら、日本において特許成立しているものが、欧州及び米国においてはいまだ特許が成立していないことも明らかとなった。今後、各国特許庁のハーモナイゼーションが更に進展すること、及び、日本弁理士が海外での権利化対応スキルをよりいっそう向上させて、出願人及び発明者と積極的に協力関係を築いていくことが期待される。

４　網膜再生医療にかかわる網膜色素上皮細胞（ＲＰＥ）に関する特許調査（井上　恵雄）

４－１　調査の目的
　近年のＥＳ細胞研究、及び iPS 細胞研究の長足の進歩により、現在、かかる研究成果を医療の現場で再生医療技術として応用展開の可能性が図られつつある。そのなかでも、眼科の網膜症おいては、投与すべき移植細胞数が他の臓器・組織のそれに対して少なくて済むことや免疫拒絶反応が比較的激しくない等の

特長から、再生医療の先兵として位置づけられている。この分野の研究では、日本（理化学研究所・京都大学、以下「理研」と略称する。）は世界の最先端の位置にいるが、最近、米国（アドバンスド･セル・テクノロジー社、以下「ＡＣＴ社」と略称する。）で網膜色素上皮細胞（Ｒｅｔｉｎａｌ　Ｐｉｇｍｅｎｔ　Ｅｐｉｔｈｅｌｉｕｍ，以下「ＲＰＥ」と略称する。）の移植治験の成功症例が報告されるなど、欧州陣営も含み、技術競争が激化してきている。

本調査では、理研の今後の再生技術開発にとって障碍となると予想されるＡＣＴ社の日本出願（基本特許として特許出願中、米国特許登録済み）を中心にその特許性を調査することにした。

４－２　日・欧・米の網膜再生医療の動向

４－２－１　日本

日本では、理研の高橋政代チームリーダー（理化学研究所　発生・再生科学綜合研究センター、網膜再生医療研究チーム、医学博士、医師）が中心となって、京都大学 iPS 細胞研究センター等と連携しながら当該網膜症分野のＥＳ細胞由来の視細胞移植並びに網膜色素上皮（ＲＰＥ）細胞移植にかかわる基礎研究、及び医療応用分野をリードしてきている。高橋政代らは、ＥＳ細胞からのＲＰＥ細胞への分化誘導法を確立し、２００４年に、ラットにカニクイザルのＥＳ細胞から作ったＲＰＥ細胞の移植実験を行い、ラットの視覚向上効果を実証した。現在、iPS 細胞から網膜色素上皮（ＲＰＥ）細胞への分化誘導法も確立し、２０１３年から発足する「iPS 細胞由来網膜色素上皮（ＲＰＥ）細胞移植による加齢黄斑変性治療の開発」（文部科学省、iPS 細胞を利用した再生医療の先行事例、アクションプラン対象施策）において、ヒト皮膚由来の繊維芽細胞 iPS 細胞を用いて、加齢黄斑変性患者（ウエットタイプ）を対象に臨床研究を実施する予定である。

４－２－２　欧米

カルフォルニア大学の網膜再生医療関係の研究者であった Irina ・Klimanskaya と Robert・ Lanza の研究成果に基づき、ＡＣＴ社は、ＥＳ細胞の自発的分化により製造したＲＰＥ細胞を加齢黄斑変性患者（スタルガルト病、非滲出型加齢黄斑変性（ドライタイプ））2 名に移植し、患者の視覚向上の効果が立証されたと発表している。この治験では免疫拒絶反応は認められなかったと報告しているが、移植６ヶ月後の拒絶反応の有無が重要である。

ＡＣＴ社は米国に加え、イギリス、韓国でも治験中である。この外、ＥＳ細胞由来のＲＰＥ細胞移植を計画している企業としてはロンドン大学と共同するファイザー社やイスラエル Cell Cure Neuroscience 社がある。

４－３　網膜再生医療における網膜色素上皮細胞の意義

網膜は 10 層から構成されていて、光を感知する視細胞と視細胞をサポートする網膜色素上皮細胞（ＲＰＥ）細胞が網膜の外側に位置している。

数種類ある網膜細胞の中でも、最初に光を受け取る「視細胞」と視細胞を維持するために必要な「網膜色素上皮（ＲＰＥ）細胞」のみが現在、治療対象細胞である（図１参照、高橋政代らの講演文献等から引用）。

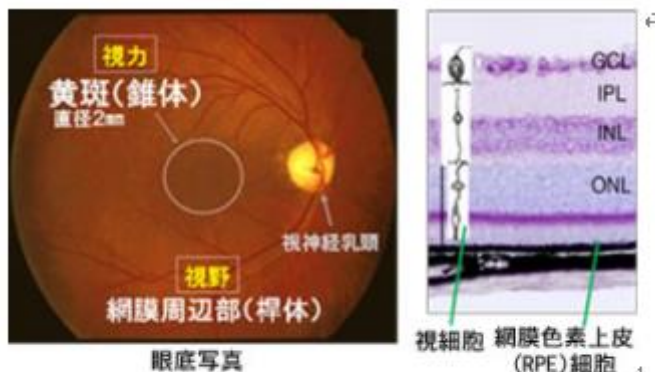
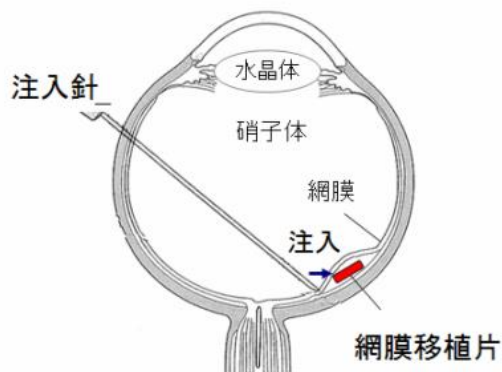



図 1. 網膜 正面図と断面図

視細胞移植による治療研究に光感受性の回復等に多くのブレークスルーがなされているが、ＥＳ細胞から視細胞を作製するときに視細胞の周りに他の細胞も多くできるので、視細胞の純化が必要であるが、視細胞のみを確実に選び出す方法は確立されていない。視細胞はこの部分がクリアされていないため、臨床試験、離床研究に行くまでにはまだ距離がある。一方、ＲＰＥ細胞移植の方は、純化技術がほぼ確立しており、すべてが網膜色素上皮（ＲＰＥ）という細胞集団がとれており、臨床研究に供せられるレベルに達している。

ＲＰＥ細胞の機能を大別すると、（ｉ）視細胞の外節という古いものを切り取

って食べてしまうことで視細胞を維持する機能、（ⅱ）ＰＥＤＦという神経の保護因子を出して視細胞に栄養を送る機能、（ⅲ）網膜に血管が入ってこないように、新生血管を抑制する機能、及び（ⅳ）水を漏らさないタイトジャンクションという細胞接合でバリアを作り、それとともに水をどんどん引くポンプ作用で、網膜が剥がれないように色素上皮に引きとどめておく機能を有する。

ＲＰＥ細胞が加齢等によっても、これらの機能が低下、または喪失すると視細胞が悪くなって光を受け取れなくなる。視細胞とＲＰＥ細胞は緊密な相補関係にあるもので、どちらが悪くなると必ず片方も悪くなる関係にある。
ＲＰＥ細胞の障害が引き起こす眼科疾患の代表例は、加齢黄斑変性（ＡＭＤ）症で、欧米では視覚障害の大半を占め、日本でも増加傾向にある（図 2 参照、高橋政代らの講演文献等から引用）。

図２ 世界の視覚障害の原因

４－４　網膜色素上皮細胞（ＲＰＥ）に関わる特許出願等の状況
４－４－１　日本の状況（主に理研、京都大学関係）

ＡＣＴ社が Klimanskaya らの研究成果を米国に特許出願した（国際出願 PCT/US2005/002273 国際公開番号(WO2005/070011)、優先権　主張日(２００５年１月２４日.)、 US(アメリカ合衆国) 11/041,382) 以前の時期に、ＥＳ細胞等からの網膜色素上皮（ＲＰＥ）細胞の分化誘導法に関する日本人研究者の特許出願は見出すことは出来なかった。僅かに、視細胞への分化誘導方法に関して、高橋政代、春田雅俊を発明者とする（株）プロテック社の特許出願（特許出願２００１－１３３７２１、出願日２００１年４月２７日、特許公開２００２－３２５５７１、公開日２００２１１月１２日、発明の名称「網膜の分化誘導法」、審査未請求、みなし取り下げ）があるのみである。

該特許出願は眼球組織由来細胞又は胚性肝細胞（ＥＳ細胞）から網膜神経細胞又は神経前駆細胞への分化誘導法にかかる発明であり、網膜色素上皮（ＲＰＥ）細胞についての言及は残念ながら見出せなかった。その後暫く過ぎて、２

００８年になって、高橋政代らは、視細胞の分化誘導法に関して国際出願（ＰＣＴ／ＪＰ２００８／０５０３０５，国際出願日２００８年1月１１日、国際公開ＷＯ２００８／０８７９１７，公開日２００８年7月２７日、現在、審査継続中）を行い、それ以降は、知的財産関係の専門家と提携して、研究成果を出来る限り特許化することに傾注し、かかる特許発明を広く世の中に公開・利用されることを目的に特許業務を遂行している。

４－４－２　ＡＣＴ社のＥＳ細胞の網膜色素上皮（ＲＰＥ）細胞への分化誘導法に関わる日本特許出願

　ＡＣＴ社のＲＰＥ細胞にかかわる特許出願等は下記のリストに掲げる（１）の特許出願を基本特許として国際出願がなされており、既にその中のいくつかは、米国で特許が成立し、特許登録がなされている（ＵＳ７７３６８９６，登録日２０１０年6月１５日)、ＵＳ７７９４７０４、登録日２０１０年9月１４日、ＵＳ７７９５０２５、登録日２０１０年9月１４日)。

（１）特許出願２００６－５５１３９２、出願日 2005 年 1 月２４日、
　特許公表　２００7-５２２１３１、公表日２００７年８月９日、
　出願人　アドバンスド・セル・テクノロジー・インク（ＡＣＴ社)、
　発明者　イリーナ・クリンスカヤ、ロバート・ランザ、
　発明の名称　網膜変性疾患治療のための改良された様式
　優先権　主張日(平 16.1.23) US(アメリカ合衆国) 60/538,964
　国際出願 PCT/US2005/002273 国際公開番号(WO2005/070011)
　国際公開日(平 17.8.4)
　審査経過　拒絶査定（２０１２年５月８日)
　海外審査経過　US 登録、AU 登録、CN 登録、EP,、CA 審査係属中

（２）特許出願２００7-５５２１１、出願日２００７年７月２０日
　特許公表２００８－５３０９８．公表日２００８年８月１４日
　出願人　アドバンスド･セル・テクノロジー　インク
　発明者　イリナ　クリマンスカヤ、ロバート　ランサ
　発明の名称　網膜の変性疾患の処置のための改良されたモーダリティー
　優先権　主張日(平 17.1.24) US(アメリカ合衆国) 11/041,382
　国際出願　PCT/US2005/025860 国際公開番号(WO2006/080952)
　国際公開日(平 18.8.3)
　審査経過　最後の拒絶理由通知中
　海外審査経過　AU 分割登録及び審査係属、CN 分割登録及び審査係属
　BRPI,CA、EP 審査係属

（３）特許出願２０１０-５２８８９９、出願日２００８年１０月１０日、
特許公表２０１１－５０００２４、公表日２０１１年１月６日、
出願人　アドバンスド・セル・テクノロジー、インク
発明の名称　ＲＰＥ細胞を生成する改良された方法およびＲＰＥ細胞の組成物
優先権　主張日(平 19.10.12) US(アメリカ合衆国) 60/998,668
主張日(平 19.10.12) US(アメリカ合衆国) 60/998,766
主張日(平 20.1.2) US(アメリカ合衆国) 61/009,911
主張日(平 20.1.2) US(アメリカ合衆国) 61/009,908
国際出願　PCT/US2008/011669 国際公開番号(WO2009/051671)
国際公開日(平 21.4.23)
審査経過　出願審査請求、手続補正書提出中
海外審査経過　US、AU,CA,EP,KR,WO 審査継続中
（４）特許出願２０１１－２０８００２、出願日２０１１年９月２２日、
特許公開２０１２-０２４１１００、公開日２０１２年２月９日
出願人　アドバンスド･セル・テクノロジー　インク
発明者　イリナ　クリマンスカヤ、ロバート　ランサ
発明の名称　網膜の変性疾患の処置のための改良されたモーダリティー
優先権　主張日(平 17.1.24) US(アメリカ合衆国) 11/041,382
原出願　関連種別(分割 (44 条 1 項)) 特許 出願番号 2007-552111
審査経過　出願審査請求、手続補正書提出中
（５）特許出願２０１２－４０４９１、出願日２０１２年２月２７日
公開番号２０１２-１４８０８５、公開日２０１２年８月９日
出願人　アドバンスド･セル・テクノロジー　インク
発明者　イリナ　クリマンスカヤ、ロバート　ランサ
発明の名称　網膜変性疾患治療のための改良された様式
優先権　主張日(平 16.1.23) US(アメリカ合衆国) 60/538,964
原出願　関連種別(分割 (44 条 1 項)) 特許 出願番号 2006-551392
審査経過　出願審査請求、手続補正書提出中

４－４－３　ＡＣＴ社の特許についての専門家の見解と対応

ＡＣＴ社の基本特許となるＵＳ７７３６８９６（ＷＯ２００５／０７００１１，上記（１）の特許出願２００６－５５１３９２）の特許発明は「ＥＳ細胞を未分化維持培地以外の培地で接着培養して着色細胞としてＲＰＥ細胞を得る方法」､「ＥＳ細胞を凝集体として浮遊培養して現れた着色細胞を播種し直しすことによりＲＰＥ細胞を得る方法」に関し、文言上、ＥＳ細胞からＲＰＥ細胞

を分化誘導する技術を広くカバーしている。しかし、ＡＣＴ社の出願明細書に基づけばＥＳ細胞の「自己分化」によりＲＰＥ細胞を得ることに発明の特徴があること、当該出願の前にサルＥＳ細胞からＲＰＥ細胞を分化誘導した報告があること等から鑑みると、上記のような広い権利が成立し得たことを疑問視するむきもある（隅蔵康一、竹田英樹編著「幹細胞の特許戦略」２０１１年、発明協会発行、壬生優子、西川伸一著、第４章、ｐｐ６２－６３　（３）Ａｄｖａｎｃｅｄ　ｃｅｌｌ　ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社 の記載を引用)。

一方、網膜再生医療分野で世界のトップを行く理研の高橋政代氏は、インタビュウーで、次のように発言している。｢最近、米国のアドバンスド・セル・テクノジー（ＡＣＴ）社がＥＳ細胞から作った網膜色素上皮（ＲＰＥ）細胞について特許を申請しました。おそらくこれは iPS 細胞にも適応（ママ適用？）されます。ヒトＥＳ細胞から網膜色素上皮（ＲＰＥ）細胞を作ることは私たちが世界で初めて報告しましたが、ＡＣＴ社が申請した内容は私たちの方法と同様の部分が多かったので、特許は認められないだろうと、サポートしてくれている特許の専門家も予想していました。ところが、米国で特許が成立してしまいました。今後どう対応すべきか、特許チームが方針を考えているところです。日本でも特許が承認されて､私たちが最初に発明したのに関わらず（拘わらず？）特許料を支払うというような事態は避けたいと考えています。｣

（文部科学省 iPS 細胞等ネットワーク, iPSTrend Trend　ウォチインタビュー「この人に聞く｣iPS 細胞を活用した臨床応用のトップバッターを目指す高橋政代氏、インタビュアー古郡悦子、２０１１年２月１８日）

４－５　アドバンスド･セル･テクノロジー社（ＡＣＴ）の日本特許出願２００６－５５１３９２（ＰＣＴ／ＵＳ２００５／００２２７３，ＷＯ２００５／０７　００１１）の審査経過

ＡＣＴ社のＥＳ細胞からの網膜色素上皮（ＲＰＥ）細胞の分化誘導法に関する基本特許なる本願の審査経過を調査した。

４－５－１　審査経過の時系列

（１）２００８年０１月３０日　補正（特許請求の範囲）
（２）２０１０年１２月０１日　最初の拒絶理由通知
（３）２０１１年０６月０１日　意見書
（４）２０１１年０６月０１日　補正
（５）２０１１年０７月２３日　刊行物等の情報提供
（６）２０１１年０８月２６日　最後の拒絶理通知
（７）２０１２年０２月２７日　意見書
（８）２０１２年０２月２７日　補正

（９）２０１２年０３月０８日　上申書
（10）２０１２年０４月２７日　刊行物等の情報提供
（11）２０１２年０５月２９日　補正却下の決定
（12）２０１２年０５月２９日　拒絶査定

４－５－２　国内移行時の特許請求の範囲
　当初のクレームは以下の通り（クレーム数１８）
【請求項１】
網膜変性を治療又は予防する方法であって、哺乳動物の胚性幹細胞に由来するＲＰＥ細胞、ＲＰＥ様細胞、ＲＰＥ又はＲＰＥ様前駆体のうち少なくとも１種からなる群から選択される細胞を使用するステップを含む方法。
【請求項２】
網膜変性の病態が、色素性網膜炎及び黄斑変性のうち少なくとも１種からなる群から選択される、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
硝子体切除術によって、前記細胞を眼の網膜下空間へと移植するステップをさらに含む、請求項１に記載の方法。
【請求項４】
懸濁液、マトリックス、又は基質中の前記細胞を移植する、請求項３に記載の方法。
【請求項５】
前記色素性網膜炎が動物モデルに伴う、請求項２に記載の方法。
【請求項６】
前記動物モデルが、ｒｄマウス、ＲＰＥ－６５ノックアウトマウス、タビー（ｔｕｂｂｙ）様マウス、ＲＣＳラット、アビシニアネコ（Ａｂｙｓｓｉｎｉａｎ ｃａｔ）、錐体変性「ｃｄ」イヌ、進行性杆体－錐体変性「ｐｒｃｄ」イヌ、初期網膜変性「ｅｒｄ」イヌ、杆体－錐体異形成１、２及び３「ｒｃｄ１、ｒｃｄ２及びｒｃｄ３」のイヌ、光受容体異形成「ｐｄ」イヌ、及びブリアール（Ｂｒｉａｒｄ）「ＲＰＥ－６５」イヌからなる群から選択される、請求項５に記載の方法。
【請求項７】
１種又は複数種の行動試験、蛍光血管造影、組織検査、及び貪食（光受容体の断片）を行う細胞の能力、ビタミンＡの代謝、密着帯の伝導性の測定や、電子顕微鏡法を用いた評価などの機能試験を用いて、前記動物モデルにおける前記治療の結果を評価する、請求項６に記載の方法。
【請求項８】

ｈＥＳ細胞を、ＲＰＥ、ＲＰＥ様、又はＲＰＥ前駆体細胞へと自発的に分化させる方法であって、
ａ）ＭＥＦ上でｈＥＳ細胞培養物を過剰増殖させるステップと、
ｂ）前記ｈＥＳ細胞培養物に細胞の厚い多層を形成させるステップと、
ｃ）前記ｈＥＳ細胞を培養するステップと、
ｄ）得られた細胞培養物から色素性のＲＰＥ、ＲＰＥ様、及び／又はＲＰＥ前駆細胞を単離し培養するステップとを含む方法。
【請求項９】
前記ＲＰＥ様細胞を単離し培養するステップが、
ａ）前記培養したｈＥＳ細胞又はＥＢ細胞を酵素で消化するステップと、
ｂ）前記色素性細胞を選択的に単離するステップと、
ｃ）ゼラチン又はラミニン上に前記単離細胞を播いて１～２日間置いて初代培養物（Ｐ０）を形成させるステップと、
ｄ）前記初代培養物を最大３週間継続して培養するステップと、
ｅ）前記ＲＰＥ様細胞を単離するステップとを含む、請求項８に記載の方法。
【請求項１０】
前記酵素が、トリプシン、コラゲナーゼ、及びディスパーゼのうち１種又は複数種からなる群から選択される、請求項９に記載の方法。
【請求項１１】
前記ＲＰＥ細胞を増殖させて新たなＲＰＥ細胞系を樹立する、請求項８に記載の方法。
【請求項１２】
前記ＲＰＥ細胞系を代替の系統へと分化させ、培養中の前記ＲＰＥ細胞系をｂＦＧＦ又はＦＧＦで処理するステップを含む、請求項１１に記載の方法。
【請求項１３】
前記新たなＲＰＥ細胞系が、異なるＥＳ細胞系に由来するとき、ＲＰＥ様細胞の、増殖速度、色素の発現、培養中での脱分化、及び培養中での再分化からなる群から選択される少なくとも１つの特徴において、すでに樹立されているＲＰＥ細胞系と異なる、請求項１１に記載の方法。
【請求項１４】
ＲＰＥ系又は前駆体を、血管新生を防止する能力が亢進したＲＰＥ細胞へと誘導する方法であって、
ａ）動物の体細胞の正常な複製寿命の少なくとも１０％が過ぎるまでテロメラーゼが短くなるように前記細胞を加齢させるステップと、
ｂ）前記体細胞を核移植供与細胞として使用して、血管形成阻害因子を過剰発現する細胞を作製し、前記血管形成阻害因子が色素上皮由来因子（ＰＥＤＦ／

ＥＰＣ－１）であり得るステップとを含む方法。
【請求項１５】
血管新生を阻害する外来遺伝子で前記体細胞を遺伝子改変する、請求項１４に記載の方法。
【請求項１６】
前記ＲＰＥ様細胞が、ＨＬＡ領域でホモ接合性があるＥＳ又は胚由来細胞バンクに由来し、その結果ＥＳ由来細胞のＨＬＡ抗原の複雑性が低下する、請求項８に記載の方法。
【請求項１７】
前記ＥＳ細胞がヒトに由来する、請求項８に記載の方法。
【請求項１８】
パーキンソン病を治療する方法であって、ＲＰＥ様細胞又は前駆細胞を移植するステップを含む方法。

４－５－３　予備的補正
　審査請求前の特許請求の範囲の自発的補正は以下の通りであった。
【請求項１】
　網膜変性を治療又は予防する医薬組成物であって、哺乳動物の胚性幹細胞に由来するＲＰＥ細胞、ＲＰＥ様細胞、ＲＰＥ又はＲＰＥ様前駆体のうち少なくとも１種からなる群から選択される細胞を含む、上記医薬組成物。
【請求項２】
　網膜変性の病態が、色素性網膜炎及び黄斑変性のうち少なくとも１種からなる群から選択される、請求項１に記載の医薬組成物。
【請求項３】
　前記治療又は予防が、硝子体切除術によって、前記細胞を眼の網膜下空間へと移植するステップをさらに含む、請求項１に記載の医薬組成物。
【請求項４】
前記細胞が、懸濁液、マトリックス、又は基質中で移植される、請求項３に記載の医薬組成物。
【請求項５】
　前記色素性網膜炎が動物モデルに伴う、請求項２に記載の医薬組成物。
【請求項６】
　前記動物モデルが、ｒｄマウス、ＲＰＥ－６５ノックアウトマウス、タビー（ｔｕｂｂｙ）様マウス、ＲＣＳラット、アビシニアネコ（Ａｂｙｓｓｉｎｉａｎ　ｃａｔ）、錐体変性「ｃｄ」イヌ、進行性杆体－錐体変性「ｐｒｃｄ」イヌ、初期網膜変性「ｅｒｄ」イヌ、杆体－錐体異形成１、２及び３「ｒｃｄ１、

ｒｃｄ２及びｒｃｄ３」のイヌ、光受容体異形成「ｐｄ」イヌ、及びブリアール（Ｂｒｉａｒｄ）「ＲＰＥ－６５」イヌからなる群から選択される、請求項５に記載の医薬組成物。

【請求項７】

１種又は複数種の行動試験、蛍光血管造影、組織検査、及び貪食（光受容体の断片）を行う細胞の能力、ビタミンＡの代謝、密着帯の伝導性の測定や、電子顕微鏡法を用いた評価などの機能試験を用いて、前記動物モデルにおける前記治療の結果を評価する、請求項６に記載の医薬組成物。

【請求項８】

ｈＥＳ細胞を、ＲＰＥ、ＲＰＥ様、又はＲＰＥ前駆体細胞へと自発的に分化させる方法であって、

ａ）ＭＥＦ上でｈＥＳ細胞培養物を過剰増殖させるステップと、

ｂ）前記ｈＥＳ細胞培養物に細胞の厚い多層を形成させるステップと、

ｃ）前記ｈＥＳ細胞を培養するステップと、

ｄ）得られた細胞培養物から色素性のＲＰＥ、ＲＰＥ様、及び／又はＲＰＥ前駆細胞を単離し培養するステップとを含む方法。

【請求項９】

前記ＲＰＥ様細胞を単離し培養するステップが、

ａ）前記培養したｈＥＳ細胞又はＥＢ細胞を酵素で消化するステップと、

ｂ）前記色素性細胞を選択的に単離するステップと、

ｃ）ゼラチン又はラミニン上に前記単離細胞を播いて１～２日間置いて初代培養物（Ｐ０）を形成させるステップと、

ｄ）前記初代培養物を最大３週間継続して培養するステップと、

ｅ）前記ＲＰＥ様細胞を単離するステップとを含む、請求項８に記載の方法。

【請求項１０】

前記酵素が、トリプシン、コラゲナーゼ、及びディスパーゼのうち１種又は複数種からなる群から選択される、請求項９に記載の方法。

【請求項１１】

前記ＲＰＥ細胞を増殖させて新たなＲＰＥ細胞系を樹立する、請求項８に記載の方法。

【請求項１２】

前記ＲＰＥ細胞系を代替の系統へと分化させ、培養中の前記ＲＰＥ細胞系をｂＦＧＦ又はＦＧＦで処理するステップを含む、請求項１１に記載の方法。

【請求項１３】

前記新たなＲＰＥ細胞系が、異なるＥＳ細胞系に由来するとき、ＲＰＥ様細胞の、増殖速度、色素の発現、培養中での脱分化、及び培養中での再分化から

なる群から選択される少なくとも１つの特徴において、すでに樹立されているＲＰＥ細胞系と異なる、請求項１１に記載の方法。
【請求項１４】
ＲＰＥ系又は前駆体を、血管新生を防止する能力が亢進したＲＰＥ細胞へと誘導する方法であって、
ａ）動物の体細胞の正常な複製寿命の少なくとも１０%が過ぎるまでテロメラーゼが短くなるように前記細胞を加齢させるステップと、
ｂ）前記体細胞を核移植供与細胞として使用して、血管形成阻害因子を過剰発現する細胞を作製し、前記血管形成阻害因子が色素上皮由来因子（ＰＥＤＦ／ＥＰＣ－１）であり得るステップとを含む方法。
【請求項１５】
血管新生を阻害する外来遺伝子で前記体細胞を遺伝子改変する、請求項１４に記載の方法。
【請求項１６】
前記ＲＰＥ様細胞が、ＨＬＡ領域でホモ接合性があるＥＳ又は胚由来細胞バンクに由来し、その結果ＥＳ由来細胞のＨＬＡ抗原の複雑性が低下する、請求項８に記載の方法。
【請求項１７】
前記ＥＳ細胞がヒトに由来する、請求項８に記載の方法。
【請求項１８】
ＲＰＥ様細胞又は前駆細胞を移植するステップを含むパーキンソン病の治療のための医薬組成物。
【請求項１９】
ヒトを除く動物モデルに伴う色素性網膜炎を治療又は予防する方法であって、哺乳動物の胚性幹細胞に由来するＲＰＥ細胞、ＲＰＥ様細胞、ＲＰＥ又はＲＰＥ様前駆体のうち少なくとも１種からなる群から選択される細胞を使用するステップを含む、上記方法。
【請求項２０】
前記動物モデルが、ｒｄマウス、ＲＰＥ－６５ノックアウトマウス、タビー（ｔｕｂｂｙ）様マウス、ＲＣＳラット、アビシニアネコ（Ａｂｙｓｓｉｎｉａｎ　ｃａｔ）、錐体変性「ｃｄ」イヌ、進行性杆体－錐体変性「ｐｒｃｄ」イヌ、初期網膜変性「ｅｒｄ」イヌ、杆体－錐体異形成１、２及び３「ｒｃｄ１、ｒｃｄ２及びｒｃｄ３」のイヌ、光受容体異形成「ｐｄ」イヌ、及びブリアール（Ｂｒｉａｒｄ）「ＲＰＥ－６５」イヌからなる群から選択される、請求項１９に記載の方法。
【請求項２１】

１種又は複数種の行動試験、蛍光血管造影、組織検査、及び貪食（光受容体の断片）を行う細胞の能力、ビタミンＡの代謝、密着帯の伝導性の測定や、電子顕微鏡法を用いた評価などの機能試験を用いて、前記動物モデルにおける前記治療の結果を評価する、請求項２０に記載の方法。

４－５－３　最初の拒絶理由の通知

拒絶理由は、特許法第３７条違反（理由１）、第２９条第１項第３号違反（理由２，３）及び第２９条第２項からなる。

拒絶理由に関する審査官の説明の全文を以下に掲示する。

１．この出願は、下記の点で特許法第３７条に規定する要件を満たしていない。

２．この出願の下記の請求項に係る発明は、その出願前に日本国内又は外国において、頒布された下記の刊行物に記載された発明又は電気通信回線を通じて公衆に利用可能となった発明であるから、特許法第２９条第１項第３号に該当し、特許を受けることができない。

３．この出願の下記の請求項に係る発明は、その出願前に日本国内又は外国において、頒布された下記の刊行物に記載された発明又は電気通信回線を通じて公衆に利用可能となった発明に基いて、その出願前にその発明の属する技術の分野における通常の知識を有する者が容易に発明をすることができたものであるから、特許法第２９条第２項の規定により特許を受けることができない。

Ａ．理由１について

請求項１－７に係る発明は、網膜変性を治療・予防する医薬組成物であって、哺乳動物の胚性幹細胞に由来する網膜色素上皮細胞（ＲＰＥ細胞）等を含む医薬組成物に関するものである。

請求項８－１３に係る発明は、ｈＥＳ細胞をＲＰＥ細胞等に自発的に分化させる方法に関するものである。

請求項１４－１７に係る発明は、ＲＰＥ系又は前駆体を、血管新生を防止する能力が亢進したＲＰＥ細胞へと誘導する方法に関するものである。

請求項１８に係る発明は、ＲＰＥ様細胞等を移植するステップを含むパーキンソン病の治療のための医薬組成物に関するものである。

請求項１９－２１に係る発明は、ヒトを除く動物モデルに伴う色素性網膜炎を治療・予防する方法であって、哺乳動物の胚性幹細胞に由来するＲＰＥ細胞等を使用するステップを含む方法に関するものである。

ここで、これらの発明に共通する、ＲＰＥ関連の細胞自体や、哺乳動物の胚性幹細胞に由来するＲＰＥ細胞等自体は、引用文献１，２の開示内容に照らして、先行技術文献に対する貢献をもたらすものではないから（Ｂの項も参照のこと。）、当該技術的特徴は、特別な技術的特徴であるとはいえない。

したがって、本願の審査においては、哺乳動物の胚性幹細胞に由来するＲＰＥ細胞等を用いて網膜変性を治療することに関する請求項１－７，１９－２１に係る発明については審査対象としたが、それ以外の請求項に係る発明については特許法第３７条以外の要件についての審査を行っていない（「特許・実用新案　審査基準」第Ⅰ部第２章４．も参照のこと）。

Ｂ．理由２，３について

・請求項　　１－７，１９－２１

・引用文献　１，２

引用文献１の第 1793 頁左欄最終段落-第 1794 頁右欄第 1 段落には、加齢黄斑変性（網膜変性）患者の治療に際し網膜色素上皮細胞（ＲＰＥ細胞）の移植が行われていること、移植細胞源としてＥＳ細胞由来の網膜色素上皮細胞が用いられ得ること、及び、ＥＳ細胞由来の網膜色素上皮細胞を病態モデル動物であるＲＣＳラットに移植すると、移植されたラットの視細胞が有意に残存し、視機能も保たれることが記載されている。

引用文献２の Abstract，第 1583 頁右欄第 2 段落-第 1584 頁左欄第 2 段落には、ＥＳ細胞由来の網膜色素上皮細胞を色素性網膜炎への移植治療に用い得ることが記載されている。

また、細胞の移植方法や移植対象とする動物モデル等は当業者であれば適宜設定すべき事項である。

してみれば、上記請求項に係る発明は引用文献１，２にそれぞれ記載の発明であり、また、これらの文献の記載から当業者が容易に想到することができたものである。

なお、本願発明は「哺乳動物の胚性幹細胞に由来する」なる記載によりＲＰＥ細胞を特定しようとするものであるが、細胞の由来を特定しても、当該細胞はＲＰＥ細胞それ自体と何ら区別できるものではない。したがって、上記請求項に係る発明は、引用文献１に記載された、ＥＳ細胞由来ではない網膜色素上皮細胞を用いた網膜変性治療に関する発明に対しても新規性及び進歩性を有しない点にも留意されたい。

引　用　文　献　等　一　覧

1795

２.KAWASAKI，H. et al.，PNAS，２００２年，Vol.99，No.3，pp.1580-1585

４－５－４　補正について

（１）特許請求の範囲の補正

出願人は、前記拒絶理由に対して、特許請求の範囲をもとの請求項８～１３の発明群からなる以下の補正を行った。

以下に補正後の特許請求の範囲を記す。
【請求項１】
ｈＥＳ細胞を、ＲＰＥ細胞へと自発的に分化させる方法であって、
（ａ）ＭＥＦ上でｈＥＳ細胞培養物を過剰増殖させて細胞の厚い多層を形成させるか、又はｈＥＳ細胞から胚様体を形成させるステップと、
（ｂ）前記細胞の多層又は胚様体を、茶色色素を細胞質中に分散させて含んでいる色素性細胞の外観となるのに十分な時間で培養するステップと、
（ｃ）得られた細胞培養物から色素性細胞を単離して培養し、それによってＲＰＥ細胞を取得するステップとを含む、上記方法。
【請求項２】
ｈＥＳ細胞を、ＲＰＥ細胞へと自発的に分化させる方法であって、
（ａ）ヒト胚性幹（ｈＥＳ）細胞の多層を提供するステップと、
（ｂ）前記細胞の多層を、茶色色素を細胞質中に分散させて含んでいる色素性細胞の外観となるのに十分な時間で培養するステップと、
（ｃ）得られた細胞培養物から色素性細胞を単離して培養し、それによってＲＰＥ細胞を取得するステップとを含む、上記方法。
【請求項３】
ｈＥＳ細胞を、ＲＰＥ細胞へと自発的に分化させる方法であって、
（ａ）ｈＥＳ細胞から形成された胚様体を、茶色色素を細胞質中に分散させて含んでいる色素性細胞の外観となるのに十分な時間で提供するステップと、
（ｃ）得られた細胞培養物から色素性細胞を単離して培養し、それによってＲＰＥ細胞を取得するステップとを含む、上記方法。
【請求項４】
前記色素性細胞の外観は、自発的に起こる、請求項１～３のいずれかに記載の方法。
【請求項５】
前記ＲＰＥ細胞は、Ｐａｘ６－、ベストロフィン＋、ＣＲＡＬＢＰ＋、ＰＥＤＦ＋であり、かつＲＰＥ６５を発現する、請求項１～４のいずれかに記載の方法。
【請求項６】
前記色素性細胞は、上皮細胞に特徴的な敷石状（ｃｏｂｂｌｅｓｔｏｎｅ）の、多角形の外観を有する、請求項１～５のいずれかに記載の方法。
【請求項７】
ステップ（ｂ）における前記培養が、前記ｈＥＳ細胞を、外来的に添加された塩基性ＦＧＦを欠き、外来的に添加されたＬＩＦを欠きかつ外来的に添加されたプラズマネート（Ｐｌａｓｍａｎａｔｅ）を欠く培地中で培養することを

含む、請求項１～６のいずれかに記載の方法。
【請求項８】
　ステップ（ｂ）における培養の持続時間が、少なくとも６週間である、請求項１～７のいずれかに記載の方法。
【請求項９】
　ステップ（ｂ）における培養の持続時間が、約６週間から約８週間の間である、請求項１～７のいずれかに記載の方法。
【請求項１０】
　ステップ（ｂ）における培養の持続時間が、約３ヶ月から約５ヶ月の間である、請求項１～７のいずれかに記載の方法。
【請求項１１】
　前記色素性上皮細胞を単離するステップが、ステップ（ｂ）の培養された細胞を、トリプシン、コラゲナーゼ、及びディスパーゼからなる群から選択される１つ以上の酵素と接触させることを含む、請求項１～１１のいずれかに記載の方法。
【請求項１２】
　請求項１～１１のいずれかに記載の方法により作成されたＲＰＥ細胞の、網膜変性の治療又は予防のための医薬を製造するための、使用。
【請求項１３】
　請求項１～１１のいずれかに記載の方法により作成されたＲＰＥ細胞の、パーキンソン病の治療のための医薬を製造するための、使用。
【請求項１４】
　予防又は治療を必要とする非ヒト対象における網膜変性を予防又は治療する方法であって、請求項１～１１のいずれかに記載の方法により作成されたＲＰＥ細胞を前記対象の眼に投与することを含む、上記方法。
【請求項１５】
　治療を必要とする非ヒト対象におけるパーキンソン病を治療する方法であって、請求項１～１１のいずれかに記載の方法により作成されたＲＰＥ細胞を前記対象の脳に移植することを含む、上記方法。
【請求項１６】
　前記網膜変性が、スタルガルト（Ｓｔａｒｇａｒｄｔ）病、網膜色素変性症、及び黄斑
変性症からなる群から選択される、請求項１４に記載の方法。
【請求項１７】
　前記対象が、網膜色素変性症を伴う動物である、請求項１４に記載の方法。
【請求項１８】

前記動物が、ｒｄマウス、ＲＰＥ－６５ノックアウトマウス、タビー（ｔｕｂｂｙ）様マウス、ＲＣＳラット、アビシニアネコ（Ａｂｙｓｓｉｎｉａｎ　ｃａｔ）、錐体変性「ｃｄ」イヌ、進行性杆体－錐体変性「ｐｒｃｄ」イヌ、初期網膜変性「ｅｒｄ」イヌ、杆体－錐体異形成１、２及び３「ｒｃｄ１、ｒｃｄ２及びｒｃｄ３」のイヌ、光受容体異形成「ｐｄ」イヌ、及びブリアール（Ｂｒｉａｒｄ）「ＲＰＥ－６５」イヌからなる群から選択される、請求項１７に記載の方法。

【請求項１９】

１種又は複数種の行動試験、蛍光血管造影、組織検査、及び機能試験を用いて、前記動物モデルにおける前記治療の結果を評価する、請求項１８に記載の方法。

【請求項２０】

前記投与するステップが、前記眼の網膜下空間の中への硝子体切除術を含む、請求項１４に記載の方法。

【請求項２１】

前記細胞が、懸濁液、マトリックス、又は基質中で移植される、請求項２０に記載の方法。

【請求項２２】

ヒト胚性幹細胞から自発的に分化した単離されたＲＰＥ細胞であって、

前記単離されたＲＰＥ細胞は、Ｏｃｔ４、Ｓｏｘ２、又はＴＤＧＦ１を発現する細胞を含まず、かつ前記単離されたＲＰＥ細胞は、ＲＰＥ培地中で培養物で維持されることができ、前記ＲＰＥ培地は、５０％ＭＥＦ培地及び５０％ＥＢ培地からなり、前記ＭＥＦ培地は、高グルコースＤＭＥＭ、２ｍＭ　ＧｌｕｔａＭＡＸ　Ｉ、及び５００μｇ／ｍｌペニシリン、５００μｇ／ｍｌストレプトマイシン及び１６％仔ウシ血清（ＦＣＳ）からなり、前記ＥＢ培地は、ノックアウト高グルコースＤＭＥＭ、５００μｇ／ｍｌペニシリン、５００μｇ／ｍｌストレプトマイシン、１％非必須アミノ酸溶液、２ｍＭ　ＧｌｕｔａＭＡＸ　Ｉ、０．１ｍＭβ－メルカプトエタノール、４ｎｇ／ｍｌ　ｂＦＧＦ、１ｎｇ／ｍｌヒトＬＩＦ，８．４％の血清リプレースメント及び８．４％ＰＬＡＳＭＡＮＡＴＥ（登録商標）からなる、上記単離されたＲＰＥ細胞。

【請求項２３】

前記ＲＰＥ細胞は、Ｐａｘ６－、ベストロフィン＋、ＣＲＡＬＢＰ＋、ＰＥＤＦ＋であり、かつＲＰＥ６５を発現する、請求項２２に記載の単離されたＲＰＥ細胞。

【請求項２４】

前記色素性細胞は、上皮細胞に特徴的な敷石状（ｃｏｂｂｌｅｓｔｏｎｅ）

の、多角形の外観を有する、請求項２２に記載の単離されたＲＰＥ細胞。
【請求項２５】
請求項２２に記載の単離されたＲＰＥ細胞であって、ｈＥＳ細胞を細胞ＲＰＥ細胞へと自発的に分化させる方法により調製され、前記方法は、
（ａ）ＭＥＦ上でｈＥＳ細胞培養物を過剰増殖させて細胞の厚い多層を形成させるか、又はｈＥＳ細胞から胚様体を形成させるステップと、
（ｂ）前記細胞の多層又は胚様体を、茶色色素を細胞質中に分散させて含んでいる色素性細胞の外観となるのに十分な時間で培養するステップと、
（ｃ）得られた細胞培養物から色素性細胞を単離して培養し、それによってＲＰＥ細胞を取得するステップとを含む方法である、上記単離されたＲＰＥ細胞。
【請求項２６】
請求項２２に記載の単離されたＲＰＥ細胞であって、ｈＥＳ細胞を細胞ＲＰＥ細胞へと自発的に分化させる方法により調製され、前記方法は、
（ａ）ヒト胚性幹（ｈＥＳ）細胞の多層を提供するステップと、（ｂ）前記細胞の多層を、茶色色素を細胞質中に分散させて含んでいる色素性細胞の外観となるのに十分な時間で培養するステップと、
（ｃ）得られた細胞培養物から色素性細胞を単離して培養し、それによってＲＰＥ細胞を取得するステップとを含む方法である、上記単離されたＲＰＥ細胞。
【請求項２７】
請求項２２に記載の単離されたＲＰＥ細胞であって、ｈＥＳ細胞を細胞ＲＰＥ細胞へと自発的に分化させる方法により調製され、前記方法は、
（ａ）ｈＥＳ細胞から形成された胚様体を、茶色色素を細胞質中に分散させて含んでいる色素性細胞の外観となるのに十分な時間で提供するステップと、
（ｃ）得られた細胞培養物から色素性細胞を単離して培養し、それによってＲＰＥ細胞を取得するステップとを含む方法である、上記単離されたＲＰＥ細胞。
【請求項２８】
前記色素性細胞の外観は、自発的に起こる、請求項２５～２７のいずれかに記載の単離されたＲＰＥ細胞。
【請求項２９】
ステップ（ｂ）における前記培養が、前記ｈＥＳ細胞を、外来的に添加された塩基性ＦＧＦを欠き、外来的に添加されたＬＩＦを欠きかつ外来的に添加されたＰＬＡＳＭＡＮＡＴＥ（登録商標）を欠く培地中で培養することを含む、請求項２５～２７のいずれかに記載の単離されたＲＰＥ細胞。
【請求項３０】

ステップ（ｂ）における培養の持続時間が、少なくとも６週間である、請求項２５～２７のいずれかに記載の単離されたＲＰＥ細胞。
【請求項３１】
ステップ（ｂ）における培養の持続時間が、約６週間から約８週間の間である、請求項２５～２７のいずれかに記載の単離されたＲＰＥ細胞。
【請求項３２】
ステップ（ｂ）における培養の持続時間が、約３ヶ月から約５ヶ月の間である、請求項２５～２７のいずれかに記載の単離されたＲＰＥ細胞。
【請求項３３】
前記色素性上皮細胞を単離するステップが、ステップ（ｂ）の培養された細胞を、トリプシン、コラゲナーゼ、及びディスパーゼからなる群から選択される１つ以上の酵素と接触させることを含む、請求項２５～２７のいずれかに記載の単離されたＲＰＥ細胞。
【請求項３４】
請求項１～１１のいずれかに記載の方法により作成されたＲＰＥ細胞を含む、網膜変性を予防又は治療するための、対象の眼に投与される医薬組成物。
【請求項３５】
請求項１～１１のいずれかに記載の方法により作成されたＲＰＥ細胞を含む、パーキンソン病を治療するための、対象の脳に移植される医薬組成物。
【請求項３６】
前記網膜変性が、スタルガルト（Ｓｔａｒｇａｒｄｔ）病、網膜色素変性症、及び黄斑変性症からなる群から選択される、請求項３４に記載の医薬組成物。
【請求項３７】
前記対象が、網膜色素変性症を伴う動物である、請求項３４に記載の医薬組成物。
【請求項３８】
前記動物が、ｒｄマウス、ＲＰＥ－６５ノックアウトマウス、タビー（ｔｕｂｂｙ）様マウス、ＲＣＳラット、アビシニアネコ（Ａｂｙｓｓｉｎｉａｎ ｃａｔ）、錐体変性「ｃｄ」イヌ、進行性杆体－錐体変性「ｐｒｃｄ」イヌ、初期網膜変性「ｅｒｄ」イヌ、杆体－錐体異形成１、２及び３「ｒｃｄ１、ｒｃｄ２及びｒｃｄ３」のイヌ、光受容体異形成「ｐｄ」イヌ、及びブリアール（Ｂｒｉａｒｄ）「ＲＰＥ－６５」イヌからなる群から選択される、請求項３７に記載の医薬組成物。
【請求項３９】
１種又は複数種の行動試験、蛍光血管造影、組織検査、及び機能試験を用いて、前記動物モデルにおける前記治療の結果を評価する、請求項３８に記載の

医薬組成物。
【請求項４０】
　前記対象が、ヒトである、請求項３４に記載の医薬組成物。
【請求項４１】
　前記投与するステップが、前記眼の網膜下空間の中への硝子体切除術を含む、請求項３４に記載の医薬組成物。
【請求項４２】
　前記細胞が、懸濁液、マトリックス、又は基質中で移植される、請求項４１に記載の医薬組成物。
（２）明細書の補正
　【００５２】
　ｈＥＳ細胞が胚様体（ＥＢ）を形成したとき、色素上皮細胞が最初の６～８週間中にＥＢの約１～２%に現れる（図１Ｂ）。時間が経つと、ますますＥＢは色素性細胞を発生させ、３ヶ月までにはほとんどすべてのＥＢが色素上皮領域を有していた（図１Ｄ）。ＥＢの色素性領域中にある細胞の形態は、付着培養物のものに極似していた（図１Ｄ）。
【００６１】
（実施例５）
　確実に高収量のＲＰＥ様細胞が得られる分化培養系の最適化段階的な添加を含めて、ｂＦＧＦ、インスリン、ＴＧＦ－β、ＩＢＭＸ、ｂｍｐ－２、ｂｍｐ－４又はその組合せの存在下で、フィーダー細胞上で又は胚様体（ＥＢ）としてＥＳ細胞を培養する。或いは、ＲＰＥ形成におけるＥＣＭの役割を評価する際に、様々な細胞外マトリックス被覆プレート（ラミニン、フィブロネクチン、コラーゲンＩ、コラーゲンＩＶ、マトリゲル（Ｍａｔｒｉｇｅｌ）など）上でＥＳ細胞を増殖させる。初期ＲＰＥ前駆体の分子マーカー（Ｐａｘ６、Ｐａｘ２、ｍｉｔｆ）及びＲＰＥ細胞の分子マーカー（ＣＲＡＬＢＰ、ベストロフィン、ＰＥＤＦ、ＲＥＰ６５）の発現を、種々の時間間隔でリアルタイムＲＴ－ＰＣＲにより評価して、上記で述べた作用物質の組合せの成功、及びＲＰＥ様細胞又はその前駆体を濃縮する段階的な手順を検証し判定する。この手法を用いて、ＲＰＥと、光受容体や神経網膜など他の眼組織との共通前駆体を生成することもでき、それを単離し、その分化潜在性についてさらに特徴付け、移植試験で用いることができる。
【００６９】
　ｈＥＤＣ細胞を直接分化させたとき、それは、通常は形成しないが、胚様体（ＥＢ）を形成する。色素上皮細胞は、最初の６～８週間中にこの分化した細胞及び／又はＥＢの約１～２%に現れる。時間が経つと、ますますＥＢは色素

性細胞を発生させ、３ヶ月までにはほとんどすべてのＥＢが色素上皮領域を有していた。ＥＢの色素性領域中にある細胞の形態は、付着培養物のものに極似していた。
【００７２】
付着性ｈＥＳ細胞又は胚様体（ＥＢ）で分化実験を行った。付着性分化では、ｈＥＳコロニーの堅い境界が消失するまでｈＥＳ細胞をＭＥＦ上で過剰増殖させ、そのとき培地をＥＢ培地に交換した（通常、継代してから８～１０日後）。培地は１～２日毎に交換した。ＥＢ形成では、ｈＥＳ細胞をトリプシン処理し、低付着性プレート（Ｃｏｓｔａｒ）上で、ＥＢ培地中で培養した。

４－５－５　意見書について
出願人は意見書で以下の主張をした。
（１）単一性について
補正後の特許請求の範囲はもとの請求項８～１３の発明群に対応していることより本願は発明の単一性を満たす旨を主張した。
（２）新規性及び進歩性について補正後の特許請求の範囲に係わる発明は、拒絶理由通知書において単一性を満たさないため、新規性及び進歩性等の要件について審査されていないが、拒絶理由通知書で引用された引用文献及び先行技術文献の対比から補正後の本願発明は新規性及び進歩性を有する旨を主張した。
その主張の根拠は、本願発明は「ヒトＥＳ細胞の多層細胞集団」または「胚様体」を要件としていること、ＥＳ細胞から色素性上皮細胞を取得すること、並びに成熟ＲＰＥ細胞の特徴であるＰａｘ６・マイナス（－）かつベストロヒン・プラス（＋）となっていた色素性上皮細胞等については、どの文献にも開示･示唆が無いことに基づいている旨であると述べている。

４－５－６　刊行物等の情報提供
本願発明に関して匿名で情報提供がなされた。情報提供者は当該発明分野の専門家と推測されるもので、刊行物等の提供とともに、その理由について広範かつ詳細にわたって本願発明の新規性及び進歩性の欠如（第２９条第１項第３号及び第２９条第２項違反）について論証している。
即ち、本願の出願日以前に、霊長類ＥＳ細胞から真性の網膜色素上皮（ＲＰＥ）細胞（Ｐａｘ６マイナス（－））の取得の報告がなされており、網膜再生医療研究分野では学術的に公知であるとともに当業者においても技術常識となっている旨を論述している。　以下に、情報提供者の刊行物等の提供の趣旨概要の全文を掲示する。
（ｉ）提出する刊行物等

「刊行物１」高橋政代、Ｇｅｒｉａｔｒｉｃ　Ｍｅｄｉｃｉｎｅ，２００３年、Ｖｏｌ．４１，Ｎｏ．１２，ｐｐ．１７９１－１７９５（引用文献１）
「刊行物２」Ｋａｗａｓａｋｉ，Ｈ．ｅｔ　ａｌ．、ＰＮＡＳ，２００２年、Ｖｏｌ．９９，Ｎｏ．３，ｐｐ．１５８０－１５８５（引用文献２）
「刊行物３」Haruta　Ｍ．ｅｔ　ａｌ．、Ｉｎｖｅｓｔ　Ｏｐｈｔｈａｌｍｏｌ　Ｖｉｓ　Ｓｃｉ．２００４　Ｍａｒ　４５（３）１０２０－１０２５
「刊行物４」第２回日本再生医療学会総会プログラム抄録　ｐ７５　ＳＰ１２－２　春田雅俊、高橋政代　２００３年２月２８日発行
「刊行物５」Ｉｎｖｅｓｔ　Ｏｐｈｔｈａｌｍｏｌ　Ｖｉｓ　Ｓｃｉ．２００３；４４：Ｅ－Ａｂｓｔｒａｃｔ　３８１．２００３　ARVO　２００３年５月１日発行
「刊行物６」Ｔｈｏｍｓｏｎ　ＪＡ　ｅｔａｌ．，Ｂｉｏｌ．Ｒｅｐｒｏｄ　５５　２５４－２５９　１９９６
「刊行物７」特表２００３－５２３７６６
「刊行物８」Ｋａｗａｍｏｒｉｔａ　Ｍ．　ｅｔ　ａｌ．，Ｈｕｍ　Ｃｅｌｌ．２００２　Ｓｅｐ；１５（３）：１７８－１８２　アブストラクト
「刊行物９」Ｓｕｂｒａｍａｎｉａｎ　Ｔ．，Ｓｅｍｉｎ　Ｎｅｕｒｏｌ．２００１；２１（１）：１０３－１５
「刊行物１０」ＷＯ２０１１/０６３００５
「資料１」刊行物４の第２回日本再生医療学会シンポジウム発表資料　２００３年３月１２日発表
「資料２」刊行物２のＦｉｇ５Ｄの明視野図を拡大し、抗Ｐａｘ６抗体による免疫染色図と重ね合わせて表示したもの
（ⅱ）提出の理由
（理由１）本願請求項１－４２に係る発明は、刊行物１－９及び資料１，２に記載され、もしくは、これら二に基づいて容易に発明することができたものであるから、特許法第２９条第１項第３号に該当し、若しくは特許法第２９条第２項に規定する要件を満たしていないので、特許を受けることができないものである。
（理由２）本願請求項１－４２の記載が、第３６条第６項第１号及び同第２号に規定される特許要件を満たしていないので、特許を受けることができないものである。
（ⅲ）本願発明の趣旨
　本願明細書は、哺乳動物の胚性肝細胞を分化させてＲＰＥ細胞を得ること、その細胞を網膜変性等の疾患治療に利用することについて記載しています。平成２３年６月１日付けの手続補正書で提示された請求項に関わる発明は、ｈＥ

Ｓ細胞（ヒトの胚性肝細胞）からＲＰＥ細胞を「自発的に分化させる」発明（以下、「本願発明」）に関する。
（ⅳ）本刊行物提出書の要旨
　ｈＥＳ細胞から機能的な網膜色素上皮（ＲＰＥ）細胞を分化誘導できること、ｈＥＳ細胞から多層叉は胚葉体を形成し、多様な細胞系統へ分化すること、多様な細胞を含む細胞集団から着色した細胞を単離、培養してＲＰＥ細胞として取得することは、本願発明前にすでに知られている事項に基づき当業者が容易に行いうることです。本願発明は、ＲＰＥ細胞をヒトＥＳ細胞に由来するものとして特定しようとしていますが、当該細胞はＲＰＥ細胞それ自他と何ら区別できるものではないので、刊行物１に記載されたＥＳ細胞に由来しないＲＰＥ細胞に対する発明に対しても新規性及び進歩性を有しないものです。従って、本願請求項１－２１、３４－４２は進歩性を欠如しており、本願請求項２２－３３は新規性及び進歩性を欠如しています。また、本願請求項１－２１，３４－４２は実施例に対して請求項の範囲が広すぎ、発明の詳細な説明に記載した範囲を超えて特許を請求するものであります。また、「自発的に分化させる」ことがどのような技術的意味を有するのか理解できないため、請求項に係わる発明が不明確になっています。さらに請求項２２－３３の記載は、製造方法と無関係に、物性等により直接的に特定することが不可能でもなく、困難でもない「ＲＰＥ細胞」を製造方法で特定しているため、特許を受けようとする発明を不明確にしています。
このように、本願発明は、新規性及び進歩性を欠如し、かつサポート要件に反し、また、発明が不明確であるため、特許を受けることができないものであります。

４－５－７　最後の拒絶理由通知

　拒絶理由は第２９条第１項第３号違反（理由１）、第２９条第２項違反（理由２）、第３６条第６項第１号違反、及び第３６条第６項第２号違反（理由４）からなる。
　以下に、拒絶理由に関する審査官の説明の全文を掲示する。
１．この出願の下記の請求項に係る発明は、その出願前に日本国内又は外国において、頒布された下記の刊行物に記載された発明又は電気通信回線を通じて公衆に利用可能となった発明であるから、特許法第２９条第１項第３号に該当し、特許を受けることができない。
２．この出願の下記の請求項に係る発明は、その出願前に日本国内又は外国において、頒布された下記の刊行物に記載された発明又は電気通信回線を通じて公衆に利用可能となった発明に基いて、その出願前にその発明の属する技術の

分野における通常の知識を有する者が容易に発明をすることができたものであるから、特許法第２９条第２項の規定により特許を受けることができない。
３．この出願は、特許請求の範囲の記載が下記の点で、特許法第３６条第６項第１号に規定する要件を満たしていない。
４．この出願は、特許請求の範囲の記載が下記の点で、特許法第３６条第６項第２号に規定する要件を満たしていない。

Ａ．理由１，２について

・請求項　　１２－４２
・引用文献　１，２

引用文献１には単離されたヒト由来網膜色素上皮細胞（ＲＰＥ細胞）が記載されている（第 1793 頁右欄第 3-7 行目）。同文献にはさらに、同細胞を網膜変性モデルラットであるＲＣＳラットに移植したところ、視細胞変性が抑制された点についても記載されている。

引用文献２には、単離されたヒト由来網膜色素上皮細胞を脳に移植することによりパーキンソン病を治療することが記載されている（Abstract,第 108 頁左欄最終段落-第 109 頁右欄第 1 段落）。

ここで、本願請求項２２には「ヒト胚性幹細胞から自発的に分化した」、請求項１２－１５，３４には「請求項１～１１のいずれかに記載の方法により作成された」なる記載によりＲＰＥ細胞を特定しようとする記載があるが、本願明細書の記載を検討しても、本願請求項記載のＲＰＥ細胞は、その分化・作成方法に依らず、ＲＰＥ細胞それ自体として、引用文献１、２記載の細胞と区別できるものとはいえない（要すれば特許・実用新案審査基準第 2 部第 2 章 1.5.2(3)参照）。

また、治療対象や網膜変性の種類等も、当業者であれば適宜設定すべき事項である。

したがって、請求項１２－４２に係る発明は、引用文献１、２にそれぞれ記載された発明であるか、またはこれらの文献の記載に基づいて当業者が容易に想到することができたものである。

Ｂ．理由２について

・請求項　　１２－４２
・引用文献　１，３，２

引用文献１には、加齢黄斑変性（網膜変性）患者の治療に際し、移植細胞源としてＥＳ細胞由来のＲＰＥ細胞が用いられ得ること、及び、ＥＳ細胞由来のＲＰＥ細胞をＲＣＳラットに移植すると、視細胞が有意に残存し、視機能も保たれることが記載されている（特に第 1793 頁右欄最終段落-第 1794 頁右欄第 1 段落）。

引用文献３には、ＥＳ細胞由来のＲＰＥ細胞を色素性網膜炎への移植治療に用い得ることが記載されている(特にAbstract, 第1583頁右欄第2段落-第1584頁左欄第2段落)。

したがって、引用文献１，３の記載に接した当業者であれば、網膜変性を有する患者の治療のため、ヒトＥＳ細胞に由来したＲＰＥ細胞を作成してみることは当然に想起し得る事項であり、また、得られたＲＰＥ細胞をパーキンソン病治療のような公知の用途（要すれば引用文献２参照）に用いてみることも、適宜なし得る事項である。

そして、上記請求項に係る発明の効果が、上記引用文献の記載からみて格別のものであると認めることもできない。

また、本願出願人は、平成２３年６月１日付けで提出した意見書において、上記引用文献１，３につき、引用文献１は引用文献３を参照しているのみであり、（ａ）引用文献３は色素性細胞を培養することを開示するものの、培養は真性ＲＰＥ細胞には不適合な条件下でなされているから真性ＲＰＥ細胞でない、（ｂ）同文献に開示されるＰａｘ６＋の色素性細胞はＲＰＥ前駆細胞であって成熟ＲＰＥ細胞ではない旨主張するので、以下検討する。

（ａ）については、本願請求項２２においても、本願出願人が不適合な条件と主張するフィーダー細胞や塩基性ＦＧＦの存在下であってもＲＰＥ細胞の培養が可能であることが記載されている。

また、引用文献１の第 1793 頁右欄最終行-第 1794 頁左欄第 1 段落において、特有蛋白の遺伝子発現からみて引用文献３記載の色素性細胞がＲＰＥ細胞であることを確認したこと、引用文献１の図 4 及び引用文献３の Fig.5 において、6 角形細胞の集まりである細胞シートが得られたこと、引用文献１の第 1794 頁左欄第 2 段落において、当該ＲＰＥ細胞をラットに移植して視機能が保たれたこと等が具体的に記載されており、これらの特徴からみても、引用文献１，３には、ＥＳ細胞に由来した、真性のＲＰＥ細胞が記載されているというほかない。

（ｂ）についても、引用文献３の Fig.5D からみて、色素性細胞集団にはＰａｘ６を発現しない色素性細胞も存在することが明らかであり、このような細胞は当然に成熟ＲＰＥ細胞であるといえる。

さらに、引用文献３においてＰａｘ６＋色素性細胞（ＲＰＥ前駆細胞）のみが開示されていると解したとしても、本願出願人の主張するように成熟ＲＰＥ細胞にはＰａｘ６が発現しないことが当業者にとり公知だったのであれば、同文献の記載に接した当業者であれば、網膜変性治療に用いるためのＲＰＥ細胞を得るべく、前駆細胞であるＰａｘ６＋色素性細胞から、成熟ＲＰＥ細胞、すなわちＰａｘ６－色素性細胞を作成してみる程度のことは、当然に想起することができたものであるといえる。

したがって、本願出願人の上記主張も参酌することはできない。

Ｃ．理由２について

・請求項　　１－２１，３４－４２

・引用文献　３，２

引用文献３には、ＭＥＦ上で培養された未分化サルＥＳ細胞の播種の際に、単一の細胞からコロニーを形成することは、サルＥＳ細胞はできず、ヒトＥＳ細胞の報告でもコロニー形成効率が低いため、細胞を１０－５０の細胞塊で播種し、当該細胞塊をＰＡ６細胞上で培養し色素性細胞を得、当該色素性細胞を単離して培養し、ＲＰＥ細胞を取得する点についても開示されている（第 1580 頁右欄第 3 段落-第 1581 頁左欄第 1 段落）。

ここで、上記「細胞塊」は少なくとも一部分において多層を形成しているといえ、また胚様体であるともいえるし、本願発明でいう「自発的に分化させる方法」なる記載によって培養工程が特定されるものとも認められない。よって、本願請求項１，２に係る発明と引用文献３記載の発明とを対比すると、前者はｈＥＳ細胞を用いる点で、サルＥＳ細胞を用いる後者と相違する。

しかしながら、同文献の記載に基づいた当業者であれば、網膜変性を有する患者の治療のため、ヒト由来のＲＰＥ細胞を得るべく、サルＥＳ細胞に代えてヒトＥＳ細胞を用いる程度のことは当然に想起し得たものである。また、培養時間等の条件を適宜設定してみることや得られたＲＰＥ細胞を公知の用途（要すれば引用文献２参照）に用いてみることも、当業者が通常に想起し得る事項である。

したがって、請求項１－２１，３４－４２に係る発明は、上記引用文献の記載から当業者が容易に想到することができたものである。

そして、これらの事項による格別の効果も認められない。

Ｄ．理由２について

・請求項　　１－４２

・引用文献　２－６

引用文献４には、マーモセットのＥＳ細胞について、繊維芽細胞フィーダー層上で過剰増殖させた場合に細胞分化が生じたこと（第 256 頁左欄第 3-5 行目）、６か月未分化状態で培養した後の細胞株から胚様体が形成され、４週目に自発的に分化したこと（第 257 頁 Fig.5）、マーモセットの多能性細胞は胚様体から三胚葉全てへ分化し始めること（第 258 頁左欄下から 10-9 行目）が記載されている。ここで、上記過剰増殖されたＥＳ細胞は少なくとも一部分において多層を形成しているものといえるし、胚様体自体も多層を有するものである。

引用文献５には、ヒトのような霊長類のＥＳ細胞のコロニーを凝集塊のまま非付着条件で培養することにより胚様体を形成することが記載され（特許請求

の範囲)、胚様体は基材へ再付着した後に所望の細胞系列へ分化し、造血細胞、心臓細胞系列、神経細胞系列など所望の細胞系統を得ることができる点についても記載されている（[0004],[0008]）。

そして、引用文献３，６に示されるように、ＥＳ細胞や胚様体からＲＰＥ細胞や網膜細胞へ分化させる方法は当業者にとり公知であるから、引用文献４，５に示された、分化誘導可能である胚様体等に対して、引用文献３，６に示されるような公知の分化手法を適用し、網膜細胞の一種であるＲＰＥ細胞に分化させること、及び、用いる細胞として、ヒト由来のＥＳ細胞を選択してみることは、当業者が容易に想到することができたものである。

また、培養時間等の条件を適宜設定してみることや得られたＲＰＥ細胞を公知の用途（要すれば引用文献２参照）に用いてみることも、当業者が通常に想起し得る事項である。

そして、これらの事項による格別の効果も認められない。

Ｅ．理由３について

・請求項　　１－２１，３４－４２

請求項１－３に係る発明は、ｈＥＳ細胞をＲＰＥ細胞へと分化させる方法であって、（ａ）ＭＥＦ上でｈＥＳ細胞培養物を過剰増殖させて細胞の厚い多層を形成させるか、又はｈＥＳ細胞から胚様体を形成させるステップと、
（ｂ）細胞の多層又は胚様体を、茶色色素を細胞質中に分散させて含んでいる色素性細胞の外観となるのに十分な時間で培養するステップと、
（ｃ）得られた細胞培養物から色素性細胞を単離して培養し、それによってＲＰＥ細胞を取得するステップを包含する方法に関するものであるが、実施例においては、LIF,プラズマネート,bFGF の不存在下で、過剰増殖により多層を形成させ、または胚様体を形成させた後、その状態のまま、外来分化因子をさらに添加することなく、6 週間以上培養することにより、色素性細胞を取得し、培養することでＲＰＥ細胞を取得可能であることが具体的に開示されるものの、その他の培養条件でＲＰＥ細胞を取得する点については記載されていない。

そして、細胞の分化方法においては、その培養条件等が大きく異なれば、分化後の細胞種も異なり得ることが出願時における技術常識であるといえるから、単に（ａ）～（ｃ）ステップを含むことのみが規定された上記請求項に係る発明の範囲まで、発明の詳細な説明に開示された内容を拡張ないし一般化することはできない。

したがって、請求項１－３に係る発明は、発明の詳細な説明に記載した範囲を超えるものである。また、これらの請求項を引用する他の請求項についても同様である。

Ｆ．理由４について

・請求項　　１－２１，３４－４２

請求項１－３には「自発的に分化させる」なる記載があるが、何をもって「自発的に」とするのか不明であり、これらの請求項に係る方法の具体的な工程が明らかでない。これらの請求項を引用する他の請求項についても同様である。

引　用　文　献　等　一　覧

１．高橋　政代　他，Geriatric Medicine，２００３年，Vol.41，No.12，pp.1791-1795

pp.103-115

３．KAWASAKI，H. et al.，PNAS，２００２年，Vol.99，No.3，pp.1580-1585

４．THOMSON，J.A. et al.，Biology of Reproduction，１９９６年，Vol.55，pp.254-259

５．特表２００３－５２３７６６号公報

６．KAWAMORITA，M. et al.，Human Cell，２００２年，Vol.15，No.3，pp.178-182

最後の拒絶理由通知とする理由

この拒絶理由通知は、発明の単一性の要件が満たされないために特許要件等の審査をしなかった請求項について発見した拒絶理由のみを通知するものである。

４－５－８　補正について

出願人は前記最後の拒絶理由通知に対して特許請求の範囲について以下の補正を行った。

【請求項１】

ｈＥＳ細胞を、ヒトＲＰＥ細胞へと分化させる方法であって、

（ａ）線維芽細胞フィーダー細胞上でｈＥＳ細胞培養物を過剰増殖させて細胞の厚い多層を形成させるか、又はｈＥＳ細胞から胚様体を形成させるステップと、

（ｂ）前記細胞の多層又は胚様体を、茶色色素を細胞質中に分散させて含んでいる色素性細胞の外観となるのに十分な時間で培養するステップと、

（ｃ）得られた細胞培養物から色素性細胞を単離して培養し、それによってヒトＲＰＥ細胞を取得するステップとを含む、上記方法。

【請求項２】

ｈＥＳ細胞を、ヒトＲＰＥ細胞へと分化させる方法であって、

（ａ）ヒト胚性幹（ｈＥＳ）細胞の多層を提供するステップと、

（ｂ）前記細胞の多層を、茶色色素を細胞質中に分散させて含んでいる色素

性細胞の外観となるのに十分な時間で培養するステップと、
（ｃ）得られた細胞培養物から色素性細胞を単離して培養し、それによってヒトＲＰＥ細胞を取得するステップとを含む、上記方法。
【請求項３】
ｈＥＳ細胞を、ヒトＲＰＥ細胞へと分化させる方法であって、
（ａ）ｈＥＳ細胞から形成された胚様体を提供するステップと、
（ｂ）前記胚様体を、茶色色素を細胞質中に分散させて含んでいる色素性細胞の外観となるのに十分な時間で培養するステップと、
（ｃ）得られた細胞培養物から色素性細胞を単離して培養し、それによってヒトＲＰＥ細胞を取得するステップとを含む、上記方法。
【請求項４】
前記色素性細胞の外観は、自発的に起こる、請求項１～３のいずれかに記載の方法。
【請求項５】
前記ヒトＲＰＥ細胞は、Ｐａｘ６－、ベストロフィン＋、ＣＲＡＬＢＰ＋、ＰＥＤＦ＋であり、かつＲＰＥ６５を発現する、請求項１～４のいずれかに記載の方法。
【請求項６】
前記色素性細胞は、上皮細胞に特徴的な敷石状（ｃｏｂｂｌｅｓｔｏｎｅ）の、多角形の外観を有する、請求項１～５のいずれかに記載の方法。
【請求項７】
ステップ（ｂ）における前記培養が、前記ｈＥＳ細胞を、外来的に添加された塩基性ＦＧＦを欠き、外来的に添加されたＬＩＦを欠きかつ外来的に添加されたプラズマネート（Ｐｌａｓｍａｎａｔｅ）を欠く培地中で培養することを含む、請求項１～６のいずれかに記載の方法。
【請求項８】
ステップ（ｂ）における培養の持続時間が、少なくとも６週間である、請求項１～７のいずれかに記載の方法。
【請求項９】
ステップ（ｂ）における培養の持続時間が、約６週間から約８週間の間である、請求項１～７のいずれかに記載の方法。
【請求項１０】
ステップ（ｂ）における培養の持続時間が、約３ヶ月から約５ヶ月の間である、請求項１～７のいずれかに記載の方法。
【請求項１１】
前記色素性上皮細胞を単離するステップが、ステップ（ｂ）の培養された細

胞を、トリプシン、コラゲナーゼ、及びディスパーゼからなる群から選択される１つ以上の酵素と接触させせることを含む、請求項１～１０のいずれかに記載の方法。
【請求項１２】
　請求項１～１１のいずれかに記載の方法により作成されたヒトＲＰＥ細胞の、網膜変性の治療又は予防のための医薬を製造するための、使用。
【請求項１３】
　請求項１～１１のいずれかに記載の方法により作成されたヒトＲＰＥ細胞の、パーキンソン病の治療のための医薬を製造するための、使用。
【請求項１４】
　予防又は治療を必要とする非ヒト対象における網膜変性を予防又は治療する方法であって、請求項１～１１のいずれかに記載の方法により作成されたヒトＲＰＥ細胞を前記対象の眼に投与することを含む、上記方法。
【請求項１５】
　治療を必要とする非ヒト対象におけるパーキンソン病を治療する方法であって、請求項１～１１のいずれかに記載の方法により作成されたヒトＲＰＥ細胞を前記対象の脳に移植することを含む、上記方法。
【請求項１６】
　前記網膜変性が、スタルガルト（Ｓｔａｒｇａｒｄｔ）病、網膜色素変性症、及び黄斑変性症からなる群から選択される、請求項１４に記載の方法。
【請求項１７】
　前記対象が、網膜色素変性症を伴う動物である、請求項１４に記載の方法。
【請求項１８】
　前記動物が、ｒｄマウス、ＲＰＥ－６５ノックアウトマウス、タビー（ｔｕｂｂｙ）様マウス、ＲＣＳラット、アビシニアネコ（Ａｂｙｓｓｉｎｉａｎ　ｃａｔ）、錐体変性「ｃｄ」イヌ、進行性杆体－錐体変性「ｐｒｃｄ」イヌ、初期網膜変性「ｅｒｄ」イヌ、杆体－錐体異形成１、２及び３「ｒｃｄ１、ｒｃｄ２及びｒｃｄ３」のイヌ、光受容体異形成「ｐｄ」イヌ、及びブリアール（Ｂｒｉａｒｄ）「ＲＰＥ－６５」イヌからなる群から選択される、請求項１７に記載の方法。
【請求項１９】
　１種又は複数種の行動試験、蛍光血管造影、組織検査、及び機能試験を用いて、前記動物モデルにおける前記治療の結果を評価する、請求項１８に記載の方法。
【請求項２０】
　前記投与するステップが、前記眼の網膜下空間の中への硝子体切除術を含む、

請求項１４に記載の方法。
【請求項２１】
　前記細胞が、懸濁液、マトリックス、又は基質中で移植される、請求項２０に記載の方法。
【請求項２２】
　ヒト胚性幹細胞から分化した単離されたヒトＲＰＥ細胞であって、
　前記単離されたヒトＲＰＥ細胞は、Ｏｃｔ４、Ｓｏｘ２、又はＴＤＧＦ１を発現する細胞を含まず、かつ前記単離されたヒトＲＰＥ細胞は、ＲＰＥ培地中で培養物で維持されることができ、前記ＲＰＥ培地は、５０％ＭＥＦ培地及び５０％ＥＢ培地からなり、前記ＭＥＦ培地は、高グルコースＤＭＥＭ、２mM ＧｌｕｔａＭＡＸ　Ｉ、及び５００μｇ／ｍｌペニシリン、５００μｇ／ｍｌストレプトマイシン及び１６％仔ウシ血清（ＦＣＳ）からなり、
前記ＥＢ培地は、ノックアウト高グルコースＤＭＥＭ、５００μｇ／ｍｌペニシリン、５００μｇ／ｍｌストレプトマイシン、１％非必須アミノ酸溶液、２mM　ＧｌｕｔａＭＡＸ　Ｉ、０．１mMβ－メルカプトエタノールからなる、上記単離されたヒトＲＰＥ細胞。
【請求項２３】
　前記ヒトＲＰＥ細胞は、Ｐａｘ６－、ベストロフィン＋、ＣＲＡＬＢＰ＋、ＰＥＤＦ＋であり、かつＲＰＥ６５を発現する、請求項２２に記載の単離されたヒトＲＰＥ細胞。
【請求項２４】
　前記ヒトＲＰＥ細胞は、上皮細胞に特徴的な敷石状（ｃｏｂｂｌｅｓｔｏｎｅ）の、多角形の外観を有する、請求項２２に記載の単離されたヒトＲＰＥ細胞。
【請求項２５】
　請求項２２に記載の単離されたヒトＲＰＥ細胞であって、ｈＥＳ細胞をヒトＲＰＥ細胞へと分化させる方法により調製され、前記方法は、
　（ａ）ＭＥＦ上でｈＥＳ細胞培養物を過剰増殖させて細胞の厚い多層を形成させるか、又はｈＥＳ細胞から胚様体を形成させるステップと、
　（ｂ）前記細胞の多層又は胚様体を、茶色色素を細胞質中に分散させて含んでいる色素性細胞の外観となるのに十分な時間で培養するステップと、
　（ｃ）得られた細胞培養物から色素性細胞を単離して培養し、それによってヒトＲＰＥ細胞を取得するステップとを含む方法である、上記単離されたヒトＲＰＥ細胞。
【請求項２６】
　請求項２２に記載の単離されたヒトＲＰＥ細胞であって、ｈＥＳ細胞をヒト

ＲＰＥ細胞へと分化させる方法により調製され、前記方法は、
（ａ）ヒト胚性幹（ｈＥＳ）細胞の多層を提供するステップと、
（ｂ）前記細胞の多層を、茶色色素を細胞質中に分散させて含んでいる色素性細胞の外観となるのに十分な時間で培養するステップと、
（ｃ）得られた細胞培養物から色素性細胞を単離して培養し、それによってヒトＲＰＥ細胞を取得するステップとを含む方法である、上記単離されたヒトＲＰＥ細胞。
【請求項２７】
請求項２２に記載の単離されたヒトＲＰＥ細胞であって、ｈＥＳ細胞をヒトＲＰＥ細胞へと分化させる方法により調製され、前記方法は、
（ａ）ｈＥＳ細胞から形成された胚様体を、茶色色素を細胞質中に分散させて含んでいる色素性細胞の外観となるのに十分な時間で提供するステップと、
（ｃ）得られた細胞培養物から色素性細胞を単離して培養し、それによってヒトＲＰＥ細胞を取得するステップとを含む方法である、上記単離されたヒトＲＰＥ細胞。
【請求項２８】
前記色素性細胞の外観は、自発的に起こる、請求項２５～２７のいずれかに記載の単離されたＲＰＥ細胞。
【請求項２９】
ステップ（ｂ）における前記培養が、外来的に添加された塩基性ＦＧＦを欠き、外来的に添加されたＬＩＦを欠きかつ外来的に添加されたＰＬＡＳＭＡＮＡＴＥ（登録商標）を欠く培地中で培養することを含む、請求項２５～２７のいずれかに記載の単離されたヒトＲＰＥ細胞。
【請求項３０】
ステップ（ｂ）における培養の持続時間が、少なくとも６週間である、請求項２５～２７のいずれかに記載の単離されたヒトＲＰＥ細胞。
【請求項３１】
ステップ（ｂ）における培養の持続時間が、約６週間から約８週間の間である、請求項２５～２７のいずれかに記載の単離されたヒトＲＰＥ細胞。
【請求項３２】
ステップ（ｂ）における培養の持続時間が、約３ヶ月から約５ヶ月の間である、請求項２５～２７のいずれかに記載の単離されたヒトＲＰＥ細胞。
【請求項３３】
前記色素性上皮細胞を単離するステップが、ステップ（ｂ）の培養された細胞を、トリプシン、コラゲナーゼ、及びディスパーゼからなる群から選択される１つ以上の酵素と接触させることを含む、請求項２５～２７のいずれかに記

載の単離されたヒトＲＰＥ細胞。
【請求項３４】
　請求項１～１１のいずれかに記載の方法により作成されたヒトＲＰＥ細胞を含む、網膜変性を予防又は治療するための、対象の眼に投与される医薬組成物。
【請求項３５】
　請求項１～１１のいずれかに記載の方法により作成されたヒトＲＰＥ細胞を含む、パーキンソン病を治療するための、対象の脳に移植される医薬組成物。
【請求項３６】
　前記網膜変性が、スタルガルト（Ｓｔａｒｇａｒｄｔ）病、網膜色素変性症、及び黄斑変性症からなる群から選択される、請求項３４に記載の医薬組成物。
【請求項３７】
　前記対象が、網膜色素変性症を伴う動物である、請求項３４に記載の医薬組成物。
【請求項３８】
　前記動物が、ｒｄマウス、ＲＰＥ－６５ノックアウトマウス、タビー（ｔｕｂｂｙ）様マウス、ＲＣＳラット、アビシニアネコ（Ａｂｙｓｓｉｎｉａｎ　ｃａｔ）、錐体変性「ｃｄ」イヌ、進行性杆体－錐体変性「ｐｒｃｄ」イヌ、初期網膜変性「ｅｒｄ」イヌ、杆体－錐体異形成１、２及び３「ｒｃｄ１、ｒｃｄ２及びｒｃｄ３」のイヌ、光受容体異形成「ｐｄ」イヌ、及びブリアール（Ｂｒｉａｒｄ）「ＲＰＥ－６５」イヌからなる群から選択される、請求項３７に記載の医薬組成物。
【請求項３９】
　１種又は複数種の行動試験、蛍光血管造影、組織検査、及び機能試験を用いて、前記動物モデルにおける前記治療の結果を評価する、請求項３８に記載の医薬組成物。
【請求項４０】
　前記対象が、ヒトである、請求項３４に記載の医薬組成物。
【請求項４１】
　前記投与するステップが、前記眼の網膜下空間の中への硝子体切除術を含む、請求項３４に記載の医薬組成物。
【請求項４２】
　前記細胞が、懸濁液、マトリックス、又は基質中で移植される、請求項４１に記載の医薬組成物。
【請求項４３】
　前記線維芽細胞フィーダー細胞が、ネズミ胚線維芽細胞（ＭＥＦ）である、請求項１に記載の方法。

【請求項４４】
前記線維芽細胞フィーダー細胞が、ニワトリ胚線維芽細胞である、請求項１に記載の方法。

４－５－９　意見書（上申書）について

（１）上申の理由

平成２３年８月２３日付拒絶理由通知書に対して、出願人は拒絶理由に対する十分な意見を述べた意見書を提出することができなかったので、本上申書にて上記拒絶理由（Ａ～Ｆ理由）に対する出願人の意見を提出した。

その主張の要点は次の諸点である。

（２）拒絶理由

Ａ：理由１，２について

①引用文献１及び２にはヒトＲＰＥ細胞の産生等についての開示や示唆に関する記載は一切ないこと。②異なる方法で産生したＲＰＥ細胞は、必ずしも、他の方法で産生したＲＰＥ細胞と同一でないこと。また、③ヒトＥＳ細胞由来のＲＰＥ細胞と他の供給源由来のＲＰＥ細胞との遺伝子発現には相違が存在することから、補正後の本願発明は新規性及び進歩性を有すること。以上①～③により、補正後の請求項は新規性及び進歩性を満たす旨主張した。

Ｂ：理由２について

④カニクイザルとヒトでは、進化論的には関連性があるとしても、多くの点で異なっているので、カニクイザルＥＳ細胞からＲＰＥ細胞の分化誘導法がヒトＥＳ細胞に作動するかどうか予測不可能であること。⑤引用文献３に開示されている細胞は、実は真のカニクイザルＲＰＥ細胞でなかったかもしれないこと。⑥引用文献３で開示されている色素性細胞はＰａｘ６＋であるが、成熟ＲＰＥ細胞はＰａｘ６－であること。また、⑦引用文献１に記載されている視覚回復の効果は客観的な信頼性が乏しいこと。以上④～⑦により、理由２に対する進歩性を主張した反論した。

Ｃ：理由２について

⑧引用文献３に記載されたＰＡ６細胞を使っての分化誘導方法を当業者がヒトＥＳ細胞の塊に適用しようとする理由・動機付けが生じるとは認められないこと、また、⑨引用文献３ではＰＡ６間質細胞と接触させての３週間培養のみの経過報告であり、本願発明ような３週間を超えた長期間培養を採用することについての開示・示唆が一切ないこと。以上、⑧及び⑨により、理由２に対して進歩性を有することを主張した。

Ｄ：理由２について

⑩引用文献４はマーモセットＥＳ細胞をＭＥＦ上で過剰増殖させた場合に分

化するとの点のみ開示するものであり、このような細胞集団からＲＰＥ細胞を特別に取得することが出来ることについて開示も示唆もないこと。⑪むしろ引用文献３は、ＰＡ６細胞の分化･誘導活性が「細胞表面上に存在している」事を開示しているのであるから、多層細胞集団において起こりえるであろうＥＳ細胞とＰＡ６細胞との接触の点においてはマイナスであると逆教示であること。また、⑫引用文献５，６には、当業者が胚様体からＲＰＥ細胞を取得しようと企画しようとした明白な動機付けとなるものは一切示されていないこと。以上⑩～⑫により、理由２に対して進歩性を満たすと主張した。

Ｅ：理由３について

⑬ＲＰＥ分化には特別な特殊な又は通常と異なる培養培地は何ら必要なく、むしろ、胚様体又は多層細胞集団として培養する「時間」こそが必要であるのであることの点で理由３に対してサポート要件を満たしている旨主張した。

Ｆ：理由４について、

「自発的に」との用語を削除することにより、理由４に対する明確要件を満たしている旨主張した。

以下に出願人のより具体的な主張の全文を掲示する・

（３）特許請求の範囲の補正について

請求項１～３、２２及び２５～２７から「自発的に」との記載を削除する補正をしました。この補正は明瞭でない記載の釈明を目的とするものであります。

請求項１～３、５、１２～１５、２２～２７及び２９～３５の「ＲＰＥ細胞」との記載を「ヒトＲＰＥ細胞」とする補正をしました。この補正はＲＰＥ細胞がヒトＲＰＥ細胞であることを明瞭にすることを目的とするものであります。

請求項１の「ＭＥＦ」との記載を「線維芽細胞フィーダー細胞」とする補正をしました。この補正は限定的減縮を目的とするものであります。

請求項３の「（ａ）ｈＥＳ細胞から形成された胚様体を、茶色色素を細胞質中に分散させて含んでいる色素性細胞の外観となるのに十分な時間で提供するステップと､」との記載を､「（ａ）ｈＥＳ細胞から形成された胚様体を提供するステップと、（ｂ）前記胚様体を、茶色色素を細胞質中に分散させて含んでいる色素性細胞の外観となるのに十分な時間で培養するステップと､」とする補正をしました。この補正はステップについて限定的に減縮することを目的とするものであります。

請求項１１の「請求項１～１１」との記載を「請求項１～１０」とする補正をしました。この補正は誤記の訂正を目的とするものであります。

請求項２２の「、４ｎｇ／ｍｌ　ｂＦＧＦ、１ｎｇ／ｍｌヒトＬＩＦ、８．４％の血清リプレースメント及び８．４％ＰＬＡＳＭＡＮＡＴＥ（登録商標)」との記載を削除しました。この補正はＥＢ培地の条件を明瞭にすることを目的

とするものであります。
　請求項２４の「前記色素性細胞」との記載を「前記ヒトＲＰＥ細胞」とする補正をしました。この補正は誤記の訂正を目的とするものであります。
　請求項２９から「前記ｈＥＳ細胞を､」との記載を削除する補正をしました。この補正は明瞭でない記載の釈明を目的とするものであります。
　請求項４３及び４４を追加しました。追加した請求項４３及び４４は、請求項１の発明特定事項である「線維芽細胞フィーダー細胞」をそれぞれ「ネズミ胚線維芽細胞（ＭＥＦ）」及び「ニワトリ胚線維芽細胞」に減縮したものであり、限定的減縮を目的とするものであります。
　以上の補正は適法なものであると出願人は思料致します。
（４）新規性及び進歩性（理由Ａ～Ｄ）について
　１）新規性及び進歩性についての全般的検討
　この拒絶理由においては、引用文献１及び３を主要な引用文献として引用しています。
　引用文献１は、非ヒト霊長類細胞をラットにおいて使用する実験を記載していますが、これらの非ヒト霊長類細胞をどのようにして取得したのかという作業についての技術的な詳細については一切記載していないのであります。しかしながら、引用文献１は引用文献３を引用していますので、引用文献３についても説明致します。引用文献３は、カニクイザルＥＳ細胞をＰＡ６細胞（マウス間質細胞株）上で培養した方法について記載しています。この引用文献の著者は、ＰＡ６細胞はその細胞表面上でいくつかの分化誘導因子を産生することを述べています（１５８０頁）。その具体的な分化誘導因子まではわかっていなかったが、間質細胞由来誘導活性（ＳＤＩＡ）として名付けていました。この引用文献の著者は、カニクイザルＥＳ細胞をＰＡ６細胞上で培養した場合に、ニューロン及び色素性細胞を含む複数の細胞型を産生したことを述べています。そして、同じ研究グループによるそれ以前の刊行物には、これらの培養条件ではレンズ細胞もまた産生することができたことが記載されています（例えば、前回拒絶理由通知書における先行技術文献である、Ｏｏｔｏ　ｅｔ　ａｌ.）。
　本願発明は、ヒトＲＰＥ細胞に関するものであり、一方で、引用文献１及び３は、カニクイザル細胞を使用する方法のみを記載するものであります。このような相違点があるにもかかわらず、審査官殿は引用文献１及び３に記載の方法を改変してヒト細胞に使用することは当業者にとって自明なことであったと認定しているのであります。
　さらに審査官殿は、このような認定の根拠となる証拠もなしに、引用文献１及び３に記載の方法をヒト細胞で機能させることは予期し得る範囲であったと述べているのであります。

カニクイザルが進化学的にヒトと関連性があるとしても、カニクイザルとヒトとでは、多くの点で極めて異なっているのであり、カニクイザルのような種において使用された細胞分化方法が、ヒト細胞においても作動するものであるかどうかは、予測不能なものであったのです。実際、審査官殿のこのような仮定に反して、少なくとも４つの研究グループがＰＡ６細胞上でヒトＥＳ細胞を培養していましたが、色素性上皮細胞を観察したことについては一切報告されなかったのであり、むしろニューロンを産生したことのみが報告されているのであります。（参考資料１～４を参照）。従いまして、拒絶理由の根拠とした
仮定に反して、引用文献１及び３で使用された方法は、ヒト細胞では作動しないものであるのです。実際、ＰＡ６細胞はニューロンへの分化を強力に誘導するのであり、それゆえに、ＰＡ６細胞はヒトＥＳ細胞がＲＰＥやその他の細胞型へと分化することを阻害したであろうことは明らかであるのです。従いまして、引用文献１及び３は、ヒトＲＰＥ細胞を産生することができた方法については何ら開示も示唆もしていないので、本願発明は引用文献１及び３に対して新規性及び進歩性を有するものであります。

そして、引用文献１及び３には、カニクイザルＲＰＥ細胞がこれらの引用文献の方法によって得られたのかどうかについて、一切示されていないのであります。前回意見書においても出願人が指摘しましたように、引用文献３における細胞は、実は真のカニクイザルＲＰＥ細胞ではなかったかも知れないのであり、もしかすると使用した培養条件によって何らかの非天然型の、原始の及び／又は不安定型の細胞型であったかも知れないのです。
とりわけ、引用文献３は、色素性細胞をフィーダー細胞の継続的な存在下で又は高レベルの外来的に添加された塩基性ＦＧＦの存在下で培養することしか記載していないのであります（２０ｎｇ／ｍＬ、１５８１頁右欄を参照）。ＲＰＥ培養は、フィーダー細胞や塩基性ＦＧＦの存在も必要とされないのであります（前回意見書に添付の参考資料１（Ｄｕｎｎ　ｅｔ　ａｌ.）を参照）。そして、塩基性ＦＧＦはＲＰＥ細胞を他の細胞型へとトランスフォームすることが示されていたのであります（前回意見書に添付の参考資料２（Ｊｅａｎ　ｅｔ　ａｌ.）を参照）。この主張に対して、審査官殿は、この引用文献の開示
はＲＰＥを塩基性ＦＧＦを含有する培地中で培養することを教示するものであると指摘しています。しかしながら、本願明細書の段落［００７０］には、ＲＰＥ細胞培養倍地として使用された、ＦＧＦを含有しない培地が記載されています。さらに、引用文献３には、引用文献３の方法で得られた色素性細胞はＰａｘ６＋であり、一方でＰａｘ６の発現はＲＰＥ前駆体（ｐｒｏｇｅｎｉｔｏｒ）細胞中には存在することが知られているが、成熟ＲＰＥ細胞には存在していないことが記載されています。この主張に対して審査官殿は、引用文献３の

Ｆｉｇ．５Ｄには、Ｐａｘ６について陽性ではなかったと見られるいくつかの色素性細胞が示されていると述べられています。しかしながら、この引用文献の著者は、色素性細胞はＰａｘ６＋であったことを述べているのであり、Ｐａｘ６－色素性細胞については何ら記載していないのであります。むしろ、Ｆｉｇ．５Ｄの一部分上で可視的Ｐａｘ６染色が欠失しているのは、単にアーティファクトである、例えば、写真の不完全な焼き増し複製、露光不十分、写真脱色（ｐｈｏｔｏｂｌｅａｃｈｉｎｇ）、細胞中に含まれる高含有量のメラニンによる干渉、紫外線照射ムラ、その他の原因によるとも考えることができたのです。これらの写真撮影技術上の欠点は周知のものであります。なお、Ｐａｘ６は核マーカーであるので、染色における非整合性は、恐らくは不完全な透水化（ｐｅｒｍｅａｂｉｌｉｚａｔｉｏｎ）が原因だろうと予想され、それゆえに、細胞が本当にＰａｘ６陰性であると結論付けることを可能にする以前に、実験上のさらなる確実性が要求されるであろう。それゆえ、１つの写真により示されたことと、この引用文献の著者が（図に示されたたった一つの視界だけに基づくよりも、むしろ多数のサンプルを見てきた経験に基づいて）「細胞が眼杯マーカーであるＰａｘ６について陽性であった」と述べていることとの間の潜在的な矛盾に直面したときに、この引用文献の著者が述べていることの方がより信頼性があるのであります。従いまして、当業者であれば、引用文献３の記載からだと、色素性細胞がＰａｘ６＋であったと結論付けたであろうことになるのであります。

従いまして、引用文献３は、Ｐａｘ６＋であって、さらに真正のＲＰＥを維持するためには必要でない培養条件が必要とされていた細胞を開示しているに過ぎないのであります。よって、依然として引用文献３は（さらには引用文献３においてその方法について引用している引用文献１も）、真正のカニクイザルＲＰＥ細胞を産生したのか否かについて、あるいは、虹彩色素性上皮（ＩＰＥ）細胞（この細胞は同様の形態、色素化、ＺＯ－１の発現、及びファロイジン染色パターンを有する）といったような何らかの他の細胞型、又は非天然型若しくは原始的の細胞型．が産生されたのかどうかを一切提示してはいないのであります。

なお、引用文献１は視覚回復がＲＣＳラット（網膜変性のモデル動物）において達成されたことについては述べているものの、当業者がこのように視覚回復が達成されたことを評価するための詳細な情報については一切提供されていないのであります。例えば、引用文献１は、いくつの動物を試験したのか、視覚改善の程度、視覚改善の持続時間、また、対照動物についても評価したのかについて、一切述べていないのであります。このような情報の欠落はとりわけ引用文献１が主張することの信頼性を傷つけるものであります。その理由は、

ＲＣＳラットは眼に対する最も軽微な外傷に対してさえも視覚改善を経験するとして、当該分野で周知であるからであります。例えば、参考資料５は、外科的対照（ＲＣＳラットの眼の中に針を短時間に挿入したもの）及びＰＢＳ（食塩水溶液）で注射したラットにおいて、増殖因子ａＦＧＦ又はｂＦＧＦを使用した治療と同じ程度に視細胞消失が防止されて、外顆粒層（ＯＮＬ）厚みが維持されたことを報告しています。具体的には、参考資料５の８４頁に下記の記載があります。

「網膜下又は硝子体内（ｉｎｔｒａｖｉｔｒｅａｌｌｙ）のいずれでのａＦＧＦ又はＰＢＳの注射によっても、外科的対照の場合と同様に、視細胞の回復がもたらされた・・・
しかしながら、最適に回復された領域においては、ａＦＧＦ、ＰＢＳ及び外科的対照が、時折、ｂＦＧＦと同じＯＮＬ厚みをもたらした。」

なお、参考資料５は、塩基性ＦＧＦを注射することによって、外科手術単独に比べて眼の広い部分に亘ってＯＮＬ厚みが改善されたことを述べています。引用文献３は細胞を高濃度の塩基性ＦＧＦ中で培養することを開示しているので、この因子は、引用文献１に記載されているいかなる結果に対しても貢献したものであるのかも知れないのであります。

さらに、参考資料６は、偽装外科手術に供しただけの対照ＲＣＳラットにおいては、「１２週齢（移植後８週間）での視覚行動に対する偽装効果は相当なものである」ことを記載しています。従いまして、ＲＣＳラットの眼における外科的外傷又は注射は、網膜変性を遅らせること及び視機能の喪失を防止することの両方において、相当量のかつ長期持続性の利益をもたらすことができるのであります。従いまして、引用文献１におけるこのような根拠のない主張からでは、視覚回復がＲＣＳラットにおいて達成されたのかどうかを確証をもって提示してはいなかったといえるのであり、とりわけ、対照動物を使用したか
どうか、そして改善の程度が注射の外科的外傷によって産生されたものよりも大きい程度であったのか否かについての情報は一切欠けているのであります。
本願発明の必須事項のうち、引用文献１及び３には概して記載されていない事項がある
ことから、これらの文献に特有の新規性及び進歩性の拒絶理由は解消されたものと出願人は思料致します。

２）理由Ａについて

審査官殿は、請求項１２～４２に係る発明は引用文献１及び引用文献２．に対して新規性及び進歩性を有するものではないと述べられています。本願発明の必須事項のうち、引用文献１に記載されていない事項は上記で述べたとおりです。引用文献１はヒトＲＰＥ細胞を産生する方法を可能にすることについて

は一切記載していないのであります。むしろ、ヒトＥＳ細胞を企図した場合に、引用文献１に開示された方法では、ニューロンを産生するに過ぎないのであります。本願の請求項１２～４２はそれぞれヒトＲＰＥに関する発明であるために、これらの請求項に係る発明は引用文献１に対して新規性及び進歩性を有するものであるのです。

引用文献２との対比にあたり、まず請求項１２～４２に係る発明はＥＳ細胞から産生したヒトＲＰＥである点に注目すべきであります。引用文献２は、ｈＥＳ細胞から産生したＲＰＥ細胞については一切記載していないのであり、むしろＲＰＥ細胞は被験者自身の眼から採集してもよかったことのみを記載しているに過ぎないのであります。従いまして、引用文献２は、ヒトＥＳ細胞から産生したＲＰＥ細胞について一切記載していないのであり、また引用文献２の記載に基づいてヒトＥＳ細胞から産生したＲＰＥ細胞を実施することはできないのであります。そして、引用文献２には、ＲＰＥ細胞をどのようにして取得することができたのか、又はどのように培養することができたのか、あるいはＲＰＥを取得したということをどのようにして確証させたのか、ということについての技術的な事項についてさえ何ら開示されていないのであります。また、細胞の場合には異なる方法で産生したＲＰＥ細胞であれば、必ずしも他の方法で産生したＲＰＥ細胞と同一であることはないと考えられるのであります。従いまして、本願発明と引用文献２とでは、本願発明において特定されているように、ヒトＲＰＥ細胞を作成する方法が異なっているのです。このことから、本願発明は引用文献２に対して新規性を有するのであります。本願の各請求項に係る発明においては、ヒトＲＰＥ細胞をヒトＥＳ細胞の分化により産生する発明を提供しているのであり、そのような産生方法の結果として得られる細胞は他の供給源から得られる細胞とはまったく異なるものであると出願人は思料致します。従いまして、引用文献２は本願発明のようなヒトＲＰＥ細胞を産生する方法については一切開示も示唆もしていないことから、本願発明に係る細胞は進歩性を有するものであるのです。

とりわけ、ＥＳ細胞のような多能性細胞から産生したヒトＲＰＥ細胞は、他の供給源から入手可能な細胞と比較して、優れた特徴を有しているのです。これらがＥＳ細胞から分化したことに起因して、当業者であれば、結果として得られたＲＰＥ細胞は、他の供給源から産生したＲＰＥ細胞よりも長いテロメアを有しかつ高い増殖潜在能力を有し、若い細胞に特有の優れた特徴、たとえば、紫外線ダメージ産物、酸化ダメージ産物、ＤＮＡダメージ、リポフスチン、Ｎ－及びレチニリデン－Ｎ－レチニルエタノールアミン（Ａ２Ｅ）の蓄積量が低レベルであることといった特徴を全般的に呈するであろうと、予測したのであります。例えば、本願明細書には、ＲＰＥ細胞は培養物中で容易に膨張して、

継代され（実施例２を参照）、そして複数回の継代後でさえも、予期される敷石状形態を有する色素性細胞の単層培養物を容易に形成した（図２Ｅ及び２Ｆ）ことが記載されています。対照的に、引用文献１は、ヒト組織及び非ヒト動物組織から単離した、培養したＲＰＥは、均一の形態を有する細胞単層を容易には形成しないことを述べています（１７９４ページ左欄）。従いまして、本願発明のヒトＲＰＥは、動物から単離したＲＰＥと比較して、異なった、そして優れた特徴を有しているのであります。

この優位性は、出願人側で行われている進行中のヒト臨床試験において示されたものであり、ＥＳ細胞から分化したヒトＲＰＥ細胞を、スタルガルト黄斑ジストロフィ及び乾燥性加齢性黄斑変性を有する２人の治療した患者の中に導入したのであります。これらの初期の結果は、参考資料７に記載されています。この細胞は、病原体、発熱物質、又は残存する未分化幹細胞、などといった望ましくない混入物質しないものとして大々的に特徴付けられ、培養物中で良好に増殖し、凍結保存でも生存しているのであります。参考文献に記載されているように、ヒトＲＰＥ細胞はこれらの最初の２人の患者に導入した場合に、
視覚活性の改善をもたらしたのであります。

なお、本願の実施例９では、ｈＥＳ由来のＲＰＥ細胞と２種類の他の供給源のＲＰＥ細胞（胎児ＲＰＥ及び培養したＲＰＥ細胞株ＡＲＰＥ－１９）との遺伝子発現の相違点を提示しています。これらの細胞はいずれも、ヒトＲＰＥの予期された機能及び形態学的特徴のすべてを持ち合わせ、さらに特徴的なヒトＲＰＥ遺伝子を発現しているものでありますが、その一方で、他の遺伝子についての検出された発現の相違は、恐らくは上記で説明したような本願発明のＲＰＥ細胞の優れた特徴を反映するものであると考えられます。

３）理由Ｂについて

審査官殿は請求項１２～４２に係る発明は引用文献１、３及び／又は２に対して進歩性を有するものではないと述べられています。引用文献２に記載されていない事項については、上記の章で検討したとおりであります。請求項１２～４２に係る発明に関して、引用文献２は、ｈＥＳ細胞から産生したＲＰＥ細胞については一切記載していないのであり、むしろＲＰＥ細胞は被験者自身の眼から採取してもよかったことのみを記載しているに過ぎないのであります。本願発明は、ＥＳ細胞から産生したヒトＲＰＥに関する発明であり、そして結果として得られるＲＰＥは、動物組織から得られたＲＰＥと比べて構造的にも異なり、そして優れてもいるのであります。従いまして、本願発明は引用文献２から自明なものではなく、引用文献２に対して進歩性を有するものであるのです。上記で検討したように、引用文献１及び３はヒトＲＰＥ細胞について一切記載していないばかりか、ヒト細胞で作動しない方法のみを開示しているに

過ぎないのであります。さ
らに引用文献１及び３は、カニクイザル細胞がＲＰＥ細胞であるのか、あるいは、ＩＰＥ細胞又は何らかの他の原始的若しくは非天然型の細胞型といったような、何らかの他の細胞型であるのかどうかについてすら、何ら示してはいないのであります。従いまして、請求項１２～４２に係る発明は引用文献１及び３に対して進歩性を有するものであると出願人は思料致します。

４）理由Ｃについて

審査官殿は請求項１～２１及び３４～４２に係る発明は、引用文献３及び／又は２に対して進歩性を有するものではないと述べられています。本願発明の必須事項のうち、引用文献２で記載を欠く事項については上記の章にて検討したとおりであり、請求項１２～２１及び３４～４２に係る発明は、上記検討した理由により引用文献２に対して進歩性を有するものであります。請求項１～１１に係る発明に関しては、引用文献はＥＳ細胞からヒトＲＰＥを産生する方法については何ら開示も示唆もしていないのであります。従いまして、これらの請求項に係る発明は引用文献２に対して進歩性を有するものであります。

引用文献３が記載していない事項については、上記でも検討されたことであります。短くいえば、引用文献３にはヒトＲＰＥを産生することを可能にするような記載は一切なく、さらには、それらのカニクイザル細胞がＲＰＥ細胞であったのか、それとも何らかの他の細胞型であったのかについてさえ、何も示してはいないのであります。そして、本願発明は、胚様体又は多層細胞集団としてのＥＳ細胞の培養物を記載しているのであります。審査官殿は、引用文献３にはカニクイザルＥＳ細胞を１０～５０個の細胞の塊として継代したことが記載されていることを述べ、審査官殿の見解としてこれらの細胞の塊は本願発明の胚様体又は細胞の多層集団に該当するものと考えられると述べています。しかしながら、引用文献３は、細胞の塊を使用した理由は、「マウスＥＳ細胞とは異なり、サルＥＳ細胞はＰＡ６細胞上で単一細胞からコロニーを形成しないからである」と述べているのです。しかしながら、出願人としては、ヒトＥＳ細胞は塊として使用することを経ずに継代することができることを述べさせて頂きます。むしろ、ヒトＥＳ細胞は個別の細胞として継代することができるのであります。従いまして、たとえ当業者が引用文献３の方法をヒト細胞に使用するために改変しようと企図したとしても、敢えてヒトＥＳ細胞の塊を使用する（このような方法は、カニクイザルＥＳ細胞での増殖要件であるこ
とにより採用されたに過ぎない）という理由はなかったのであります。むしろ、引用文献３はＰＡ６細胞の分化・誘導活性が「細胞表面上に存在する」（１５８０頁左欄）ことを開示しているのです。従いまして、たとえ引用文献３の方法がヒト細胞で作動するものであったとしても（上記で検討したように、そのよ

うなことはないが)、当業者がヒト細胞をＰＡ６細胞上で塊として培養しようという動機は生じなかったのであり、むしろ誘導惹起細胞との接触の度合いを増大させるために単一細胞を使用したであろうといえるのであります。

さらに、引用文献３は、ＥＳ細胞をＰＡ６間質細胞と接触させて３週間の間培養することのみを開示しているに過ぎないのであり、ＥＳ細胞又は胚様体の多層細胞集団を少なくとも６週間の間（本願の請求項８及び３０）、約６～約８週間の間（請求項９及び３１）又は約３～約５ヶ月の間（請求項１０及び３２）培養することについては開示も示唆もしていないのであります。残りの引用文献についても、ＥＳ細胞からＲＰＥ細胞を産生するために、本願発明のような培養時間を採用することについては一切開示していないのであります。従いまして、このようなさらなる理由からも、請求項８～１０及び３０～３２に係る発明は、これらの引用文献の開示に対して新規性及び進歩性を有するものであります。

５）理由Ｄについて

審査官殿は請求項１～４２に係る発明は引用文献１～６に対して進歩性を有するものではないと述べられています。引用文献１～３に記載されていない事項については、上記で詳細に説明したとおりであります。引用文献４～６は、これらの事項について一切補完するものではなく、よって引用文献１～３と組み合わせたとしても本願発明の進歩性を否定する材料とはならないのであります。むしろ、引用文献４は、審査官殿が述べているように、マーモセットＥＳ細胞をＭＥＦ上で過剰増殖させた場合に分化するという点についてのみ開示した文献であるのです。この引用文献の開示を参酌したとしても、引用文献４は、このような細胞集団からＲＰＥ細胞を特別に取得することができることについては、開示も示唆もしていないのであります。そして、例えば、ＭＥＦフィーダー細胞及びＰＡ６間質インデューサー細胞といった２つの異なるフィーダー細胞型を使用している引用文献３及び４に記載の発明において、細胞を培養する方法をどのようにして組み合わせることができたのかについては、引用文献３及び４の記載からは当業者にとっては一切不明なのであります。最終的に、拒絶理由の内容を参酌しても、当業者が引用文献３の方法を改変して、ＥＳ細胞を過剰増殖させて多層を形成させることを誘導させることを想到する動機付けが、論理的になされていないといえるのであります。むしろ引用文献３は、ＰＡ６細胞の分化・誘導活性が「細胞表面上に存在している」（１５８０頁左欄）ことを開示しているのであります。従いまして、引用文献３は、多層細胞集団において起こるであろうＥＳ細胞とＰＡ６細胞との接触を減少させることになるであろう方法については、逆教示しているといえるのであります。

引用文献５及び６は、審査官が述べているように、胚様体を作成する方法及

び分化した細胞が胚様体を培養することからの結果として得ることができることのみを開示しているに過ぎないのであります。しかしながら、引用文献５及び６は、ＲＰＥ細胞だけを特別にそこから取得することができたことについては、開示も示唆もしていないのであります。

そして、当業者が胚様体からＲＰＥ細胞を取得しようと企図しようとした明白な動機付けは一切ないといえるのであります。むしろ前段落において検討したように、引用文献３は、ＰＡ６の誘導活性が細胞表面に位置していることを述べているのであり、従いまして、胚様体．において起こるであろうようなＥＳ細胞とＰＡ６細胞との間の接触を、減少させるであろういかなる方法についても逆教示しているといえるのであります。

従いまして、引用文献４～６は、本願発明の必須事項のうち引用文献ｓ１～３には記載されていない事項を補足するものではないのであります。さらには、引用文献３自体が引用文献ｓ４～６と組み合わせることを逆教示しているのであります。その理由は、胚様体又は多層を使用することによってＥＳ細胞とＰＡ６誘導活性との間の接触を減少させたであろうことによるからであります。

（５）サポート要件（理由Ｅ）について

審査官殿は請求項１～２１及び３４～４２に係る発明は発明の詳細な説明に記載されたものではないと述べられています。特に審査官殿は、本願明細書の実施例で具体的に定義される培養倍地以外の培養倍地については十分にサポートされていない、と述べられています。

審査官殿の見解は、本願の実施例においてＥＳ細胞からＲＰＥ細胞を分化させるためには、特別な因子を添加することが必要であったのではないのかどうか、ということに重点を置いたことによるのではないかと考えられます。しかしながら、本願発明は、特殊な若しくは通常と異なる成分を一切培養倍地に添加することを必要とせずにＲＰＥを産生した方法を開示しているのであります。むしろ、実施例１及び２で使用した培地（「ＥＢ培地」）は、抗生物質、アミノ酸、還元剤β－メルカプトエタノール、及び血清代替物を補充したノックアウト高グルコースＤＭＥＭからなっているのであります（段落［００７０］の「材料及び方」を参照）。ＤＭＥＭは、一般的に使用される細胞培養倍地基剤であり、栄養素（例えば、炭素源、ビタミン類、ミネラル類、塩類、及びアミノ酸）及びｐＨ調整のための緩衝剤を提供するものであります。非必須アミノ酸及びβ－メルカプトエタノール（酸化性ダメージを反転させる機能を有する）もまた、細胞の健康性を促進するために一般的に培養倍地に添加されるものであります。血清代替物もまた、細胞培養において一般的に使用されることであり、アミノ酸、塩類、ビタミン類、及びミネラル類（例えば、鉄源である、トランスフェリン）並びにアルブミンを含む栄養素及び保護剤を提供するものであります。

製剤はＷＯ９８／３０６７９の２７～２９ページに記載されています。従いまして、ＲＰＥ分化には、特別な特殊な又は通常と異なる培養倍地．を何ら必要としないのであります。むしろ、当業者であれば培養倍地の組成（例えば、使用する緩衝剤、ビタミン類及び塩類の濃度等）を本願発明の方法の範囲内で容易に改変させることはできたのであります。細胞内シグナル及び／又はデフォルトの分化経路が、本願明細書（段落［００５５］を参照）に記載される再現性の高いＲＰＥ形成という結果につながることを、出願人は指摘致します。前述したことに基づけば、ＲＰＥを形成するために十分となる条件は、特異的な培地というよりはむしろ胚様体又は多層細胞集団として培養する「時間」（請求項に記載されている）こそが重要なのであります。

本願発明の方法に許容される培養条件の改変の一例として、本願の実施例１及び２では、フィーダー細胞（不活性化ＭＥＦ）の存在下又は非存在下で培養したｈＥＳ細胞からのＲＰＥ分化を提示しています：胚様体はＭＥＦの非存在下で培養したが、その一方で、多層細胞集団はＭＥＦ上で増殖し、ＲＰＥが形成された間もＭＥＦ上のままとしました。従いまして、ＭＥＦはＲＰＥ分化にとって寛容性があるが、必要ではないのであります。

これらの結果は、ｈＥＳ細胞を多層細胞集団又は胚様体として培養した場合に（例えば、請求項１～３に記載されるように）、特別な培養倍地を必要とせずに所定の十分な時間で、ＲＰＥが予期されるように発生することを確立しているのであります。そして、請求項１～３には、細胞の多層又は胚様体を「色素性細胞が茶色色素をその細胞質中に分散して含む外観となるのに十分な時間の間で」培養することという、本願発明の普遍的な要件を含んでいることに注目すべきであります。従いまして、特定の培地組成に限定する必要はなく、当業者であれば過度の実験を強いることなく本願発明は実施することができるものと出願人は思料致します。

また、本願出願時以降に発行された刊行物ではありますが、本願発明の方法において異なる培養倍地の条件の寛容性を評価するさらなる証拠を提出致します。

「自発的」であり独特の増殖培地には依存しないものとしてのＲＰＥ導出が特徴付けられることは、本願発明者らによりその後発行されたさらなる刊行物において、評価されているのであります。例えば、参考資料８は、フィーダー非含有ｈＥＳ培養物並びに種々の他の条件で培養したｈＥＳから取得したＲＰＥを以下のように報告しています。

「我々は、ヒトＥＳ細胞のＲＰＥ様細胞への一貫した分化を、長期間のフィーダー層上で又はフィーダー非含有でゼラチン、フィブロネクチン、ラミニン、コラーゲンタイプＩ及びＩＶ上で、あるいはＥＢ中でのいずれかで増殖させた

ｈＥＳ培養物を含む動物性共培養物に依存することがないものとして取得した。」（参考資料８、２３５頁）

従いまして、培養基材は容易に改変することができ、そしてフィーダー細胞は必要ないのであります。さらなる同一出願人による刊行物は、胚様体を本願実施例１及び２とは異なる培地、すなわち、低タンパク質培地ＭＤＢＫ－ＧＭ（Ｓｉｇｍａ）及びＯｐｔｉＰＲＯ　ＳＦＭ（Ｇｉｂｃｏ）の中で培養することによってＲＰＥを産生することを報告しています（同一出願人による出願ＷＯ／２００９／０５１６７１の実施例１を参照）。これらの取扱説明書によれば、いずれも血清非含有培地であり、ＯｐｔｉＰＲＯ　ＳＦＭは動物由来成分非含有であり、ＭＤＢＫ－GMは約１５０μｇ／ｍＬの動物性タンパク質を含有する（取扱説明書）。異なる培地を使用したにもかかわらず、ＷＯ／２００９／０５１６７１はｈＥＳ細胞. からのＲＰＥの再現性のある分化を報告しているのです。

本願発明者らによるさらなる出願では、この開示された方法を使用することで再現性を成功することが得られたことを要約に記載しているのであります。

「我々の実験において、６～８週間の分化の過程を通じての１００を超える独立の実験において、現在のところ２０より多いヒトＥＳＣ株がＲＰＥ細胞を産生した。」（参考資料９）

前述の例では、種々の増殖条件を使用することにより成功したＲＰＥ導出を容易に実施することができることが提示されています。ＭＥＦは分化の最中に存在しているが、それは任意付加事項であります。ＥＳ細胞は、フィーダー細胞上で、あるいはフィーダー非存在培養物として種々の異なる基材上で増殖させることができるのです。増殖培地は血清代替物を含んでいてもよく又は血清非含有であってもよく、動物由来成分を含んでいてもいなくてもよく、また低タンパク質培地であってもなくてもよいのであります。これらの参考資料は、特別な特殊な又は通常と異なる培地を必要とせずに分化を自然発生的に生じさせることができるという、出願人の意見をさらに裏付けるものであります。従いまして、本願発明は、特別な培養倍地. による限定をしなくても、本願明細書の記載及び技術常識により十分に裏付けられているものであると出願人は思料致します。

（６）記載不明瞭（理由Ｆ）について

審査官殿は、「自発的に」との用語が不明確であるとして拒絶しています。従いまして、「自発的に」との用語を削除しました。なお、この用語は本願において一貫して、特別な増殖因子の添加、インデューサー細胞への曝露、又は他の外因的薬剤を一切必要とすることなく、例示された方法を使用してＲＰＥ細胞が産生されたことを述べているのであります。ＲＰＥ分化について外因性薬剤

は一切必要とされなかったので、本願発明では、「許容的な及び／又は指示的な分化シグナルは、ｈＥＳ細胞の分化導出物により産生された細胞外マトリクス及び増殖因子から来ているものである」との仮説を立てたのであります（本願明細書の段落［００４８］）。従いまして、本願明細書の記載に照らせば、「自発 に」との用語は十分に明確であったことを述べさせて頂きます。
（７）むすび
　上記の補正及び説明により、新規性、進歩性、サポート要件及び記載不明瞭の問題は解消したものと出願人は思料致します。従いまして、なにとぞ速やかに本願について特許査定を賜りたく切にお願い致します。
【提出物件】
5-1276 の写し
　【物件名】　参考資料２　　Wichterle et al., Cell, 2002, 110:385-397 の写し
　【物件名】　参考資料３　　Zeng et al., Stem Cells, 2004, 22:925-940 の写し
4-48 の写し
3-86 の写し
　【物件名】　参考資料６　　Lawrence et al. (IOVS, 2000, 41:518-528)の写し
0140-6736(12)60028-2, 2012 年１月２４日にオンラインで閲覧可能)の写し
5 (2004)の写し
:131-42 (2008)の写し
【提出物件の特記事項】　手続補足書で提出します。

４－５－１０　刊行物等の情報の提供
　情報提供者は、出願人の提出した補正書、意見書（上申書）に対して刊行物等の情報を提供した。特筆すべきことは、引用文献３に開示されているカニクイザルＥＳ細胞からの真のカニクイザルＲＰＥ細胞を分化誘導に対して出願人は、疑わしき旨、意見書で開陳しておりますが、本願の発明人であるＩｒｉｎａ　Ｋｌｉｍａｎｓｋａｙａ氏は出願人の提出した参考資料９（Irina Klimanskaya et al., Nature Reviews Drug Discovery, 7:131-42 (2008)）において、引用文献３が霊長類ＥＳ細胞とＰＡ＆との共培養によりＲＰＥ細胞を産生していることを記述していることである（同、１３９頁右欄３段落）。
以下に、刊行物等の情報提供者の全文を掲示する。
（ｉ）提出する刊行物等
「刊行物１」Ｚｈａｏ，Ｓ．ｅｔ　ａｌ．，Ｂｒａｉｎ　Ｒエｓ。、１９９５Ａ

ｐｒ．２４　６７７（２）３００－３１０
「刊行物１」Ｚｈａｏ，Ｓ．ｅｔ　ａｌ．，Ｉｎｔ　Ｒｅｖ　Ｃｙｔｏｌ．　１９９７　１７１　２２５－２６６
「刊行物１」Ｈａｒｕｔａ，Ｍ．ｅｔ　ａｌ．，Ｉｎｖｅｓｔ　Ｏｐｈｔｈａｌｍｏｌ　Ｖｉｓ　Ｓｃｉ．２００４　Ｍａｒ　４５（３）１０２０－１０２５
（ⅱ）提出の理由
する要件を満たしていないので、特許を受けることができないものである。
である。
（ⅲ）本刊行物提出書の要旨
　カニクイザルＥＳ細胞から真のＲＰＥ細胞が分化誘導されている引用文献３に接した当業者であれば、引用文献２－６、刊行物１，２及び本願出願時の技術常識を参酌して、本願発明を導き出すことができ、又は当業者が極めて容易に着想できるため、本願請求項１－４４は新規性及び進歩性を欠如しています。
　また、平成２４年２月２７日付手続補正書（以下、「補正書」）における、「自発的に」との用語が削除された補正後の請求項は、発明の詳細な説明に記載された範囲を超えて特許を請求することに相当し、また、補正前の請求項の記載は、「自発的に」の用語が具体的にどのような技術的意味を有するのか理解できないため、請求項に係わる発明が不明確である。

４－５－１１　補正の却下の決定
　最後の拒絶理由通知に対する出願人の補正は却下された。
　以下に補正の却下の決定の全文を掲示する。
結　論
　平成２４年　２月２７日付け手続補正書でした明細書、特許請求の範囲又は図面についての補正は、次の理由によって却下します。
理　由
　本願出願人は、平成２４年２月２７日付け手続補正書により特許請求の範囲を補正し、その中で、（ａ）補正前の請求項１等の「ＭＥＦ」という記載を「線維芽細胞フィーダー細胞」とし、（ｂ）「自発的に」なる記載を削除し、（ｃ）補正前の請求項２２の「、４ｎｇ／ｍｌ　ｂＦＧＦ、１ｎｇ／ｍｌヒトＬＩＦ、８．４％の血清リプレースメント及び８．４％ＰＬＡＳＭＡＮＡＴＥ（登録商標）」という記載を削除し、また、（ｄ）請求項４４を追加する補正等を行った。
　しかしながら、（ａ）の補正について、平成２４年３月８日付けで提出された上申書において、本願出願人は限定的減縮を目的とするものである旨主張するが、「線維芽細胞フィーダー細胞」なる用語には、補正前のＭＥＦのみならずニワトリ胚線維芽細胞等も包含されることとなるから、当該補正は特許法第１７

条の２第４項第２号に規定する特許請求の範囲の減縮を目的とするものとはいえず、特許法第１７条の２第４項第１号，第３号，第４号に掲げる事項を目的としたものではないことも明らかである。（ｄ）の請求項４４を追加する補正についても同様である。

また、（ｂ）の補正について、本願出願人は明りょうでない記載の釈明を目的とするものである旨主張するが、上申書の（６）において「自発的に」なる用語について、「この用語は本願において一貫して、特別な増殖因子の添加、インデューサー細胞への曝露、又は他の外因的薬剤を一切必要とすることなく、例示された方法を使用してＲＰＥ細胞が産生されたことを述べているのであり」なる記載があることからも、請求項１等に係る方法の工程等を少なくとも何らかの意味で特定しようとする記載であったことが明らかであるから、当該記載を削除してそのような特定のない方法とする補正は、明りょうでない記載の釈明を目的としたものとはいえないし、明らかに請求の範囲を拡張しようとするものである。また、当該補正が特許法第１７条の２第４項第１号－第３号に掲げる事項を目的としたものではないことも明らかである。

また、（ｃ）の補正について、本願出願人は、ＥＢ条件を明りょうとするためのものである旨主張するが、補正前に存在した上記記載は、文理上、それ自体意味が明らかであり、発明も技術的に明りょうに特定されていたものといえるから、当該補正は特許法第１７条の２第４項第４号に規定する明りょうでない記載の釈明を目的とはいえないし、条件の削除により明らかに請求の範囲を拡張しようとするものである。また、当該補正が特許法第１７条の２第４項第１号－第３号に掲げる事項を目的としたものではないことも明らかである。

したがって、平成２４年２月２７日付け手続補正書による補正は、特許法第１７条の２第４項の規定に違反するものであるから、同法第５３条第１項の規定により上記結論のとおり決定する。

また、平成２４年２月２７日付け手続補正書による請求項３の補正は、限定的減縮を目的としているが、当該補正後の請求項３に係る発明は、以下イ及びロの理由から独立して特許を受けることができない。

よって、この補正は特許法第１７条の２第５項において準用する同法第１２６条第５項の規定に違反するものでもあるから、この点においても、同法第５３条第１項の規定により上記結論のとおり決定する。

イ．補正後の請求項３

・根拠条文　特許法第２９条第２項

・引用文献　３

・備考：

引用文献３には、ＥＳ細胞由来のＲＰＥ細胞を色素性網膜炎への移植治療に用い得ることが記載されている(特にAbstract, 第1583頁右欄第2段落-第1584頁左欄第2段落)。同文献にはさらに、ＭＥＦ上で培養された未分化サルＥＳ細胞の播種の際に、単一の細胞からコロニーを形成することは、サルＥＳ細胞はできず、ヒトＥＳ細胞の報告でもコロニー形成効率が低いため、細胞を１０－５０の細胞塊で播種し、当該細胞塊をＰＡ６細胞上で培養し色素性細胞を得、当該色素性細胞を単離して培養し、ＲＰＥ細胞を取得する点についても開示されている（第1580頁右欄第3段落-第1581頁左欄第1段落)。

ここで、上記「細胞塊」は本願発明でいう胚様体に相当するものといえ、また、当該細胞塊は、ＰＡ６細胞上で、色素性細胞の外観となるのに十分な時間で培養されているものと認められる。よって、本願請求項３に係る発明と引用文献３記載の発明とを対比すると、前者はｈＥＳ細胞を用いる点で、サルＥＳ細胞を用いる後者と相違する。

しかしながら、ヒト患者の治療に応用すべく、ヒト以外の動物細胞において得られた分化手法や治療活性に関する知見について、同様の分化能や治療活性を期待してヒト由来の細胞に対しても適用することは当業者の通常の創作能力の発揮である上、引用文献３においても、サル由来の細胞を用いる理由についてカニクイザルが前臨床研究で広く用いられるためであること（第1580頁右欄第 2 段落）や、ヒトとカニクイザルとが系統発生学的に密接な関係性を有すること（第1584頁右欄第2段落）が述べられているところである。

してみれば、同文献の記載に基づいた当業者であれば、網膜変性を有する患者の治療のため、ヒト由来のＲＰＥ細胞を得ることを期待して、同文献記載のサルＥＳ細胞に代えてヒトＥＳ細胞を用いる程度のことは当然に想起し得たものである。

したがって、請求項３に係る発明は、上記引用文献の記載から当業者が容易に想到することができたものである。

そして、これらの事項による格別の効果も認められない。

ロ．補正後の請求項３

・根拠条文　特許法第２９条第２項

・引用文献　１－６

・備考：

引用文献４には、マーモセットのＥＳ細胞について、繊維芽細胞フィーダー層上で過剰増殖させた場合に細胞分化が生じたこと(第256頁左欄第3-5行目)、６か月未分化状態で培養した後の細胞株から胚様体が形成され、４週目に自発的に分化したこと（第257頁Fig.5)、マーモセットの多能性細胞は胚様体から

三胚葉全てへ分化し始めること（第258頁左欄下から10-9行目）が記載されている。引用文献５には、ヒトのような霊長類のＥＳ細胞のコロニーを凝集塊のまま非付着条件で培養することにより胚様体を形成することが記載され（特許請求の範囲）、胚様体は基材へ再付着した後に所望の細胞系列へ分化し、造血細胞、心臓細胞系列、神経細胞系列など所望の細胞系統を得ることができる点についても記載されている（[0004],[0008]）。

そして、引用文献３，６に示されるように、ＥＳ細胞や胚様体からＲＰＥ細胞や網膜細胞へ分化させる方法は当業者にとり公知であるし、ＲＰＥ細胞等が色素性網膜炎への移植治療やパーキンソン病治療に有用であることも広く知られていたのであるから（引用文献１－３）、引用文献４，５に示された、分化誘導可能である胚様体等に対して、引用文献３，６に示されるような公知の分化手法を適用し、疾患治療に有用な、網膜細胞の一種であるＲＰＥ細胞に分化させること、及び、用いる細胞として、ヒト由来のＥＳ細胞を選択してみることは、当業者が容易に想到することができたものである。

そして、これらの事項による格別の効果も認められない。

＜引用文献等一覧＞

1795

1, pp.103-115

３.KAWASAKI, H. et al., PNAS, ２００２年, Vol.99, No.3, pp.1580-1585

４.THOMSON, J.A. et al., Biology of Reproduction, １９９６年, Vol.55, pp.254-259

５.特表２００３－５２３７６６号公報

82

４－５－１２　拒絶査定

以下に拒絶査定の全文を掲示する。

この出願については、平成２３年　８月２３日付け拒絶理由通知書（以下、「拒絶理由通知書」という。）に記載した理由１－４によって、拒絶をすべきものです。

なお、意見書及び上申書の内容を検討しましたが、拒絶理由を覆すに足りる根拠が見いだせません。

備考：

平成２４年２月２７日付けで提出された手続補正書による手続補正は、当該拒絶査定と同日付けでなされた補正の却下の決定により却下されている。

本願出願人は、平成２４年２月２７日付けで提出した意見書においては、上記拒絶理由通知書で通知した拒絶理由に対して実質的に反論を述べておらず、その後提出された上申書において上記拒絶理由に対する反論を意見として述べているが、当該上申書の内容を検討しても、以下Ａ－Ｆの通り、拒絶理由を覆すに足りる根拠を見出すことはできない。

Ａ．理由１，２

・請求項　　１２－４２

・引用文献　１，２

本願出願人は上記上申書において、（Ａ－１）引用文献１及び２は、ヒトＲＰＥ細胞を産生する方法を可能にすることやｈＥＳ細胞から産生したＲＰＥ細胞については一切記載していない、

（Ａ－２）細胞の場合には異なる方法で産生したＲＰＥ細胞であれば、必ずしも他の方法で産生したＲＰＥ細胞と同一であることはないと考えられ、とりわけ、ＥＳ細胞のような多能性細胞から産生したヒトＲＰＥ細胞は、他の供給源から入手可能な細胞と比較して、長いテロメアや増殖潜在能力等の優れた特徴を有している、（Ａ－３）本願の実施例９において示されるように、ｈＥＳ由来のＲＰＥ細胞と他の供給源のＲＰＥ細胞との遺伝子発現には相違が存在する、

として、上記請求項に係る発明は引用文献１，２に対して新規性及び進歩性を有する旨主張する。

主張点（Ａ－１）について検討するに、拒絶理由通知書においては、引用文献１，２において、「単離されたヒト由来脳膜色素上皮細胞」が開示されており（引用文献１の第 1793 頁右欄第 3-7 行目等、引用文献２の Abstract,第 108 頁左欄最終段落-第 109 頁右欄第 1 段落)、上記請求項に係る発明のヒトＲＰＥ細胞は、その分化・作成方法に依らず同一であると判断したものであり、これらの文献にｈＥＳ細胞からヒトＲＰＥ細胞を産生することが開示されていると判断したものではないから、引用文献１，２において当該事項の開示がないことは、上記判断を左右するものではない。

主張点（Ａ－２）について検討するに、テロメア長や増殖潜在能力等は、その後の培養期間や分裂回数等により当然に変化するものであるところ、上記請求項には、単に「…の方法により作成されたヒトＲＰＥ細胞」や「ヒト胚性幹細胞から分化した単離されたヒトＲＰＥ細胞」と記載されるのみで、例えばその後培養されテロメア長や増殖潜在能力等が変化した細胞をも包含されることとなる。してみると、上記主張は請求項の記載に基づいているとはいえず、上記請求項に記載のＲＰＥ細胞には、様々なテロメア長や増殖潜在能力等のものが包含されると認められるから、依然として引用文献１，２記載のヒトＲＰＥ

細胞が包含されるものといえる。
幹細胞から分化した単離されたヒトＲＰＥ細胞」と単に表現され、その後に培養されたヒトＲＰＥ細胞や他の手段による分化により得られるヒトＲＰＥ細胞を包含する上記請求項に係るＲＰＥ細胞には、様々な遺伝子プロファイルのものが包含されると認められるから、依然として引用文献１，２記載のヒトＲＰＥ細胞が包含されるものといえる。
　よって、本願出願人の上記主張は採用することができない。

Ｂ．理由２
　・請求項　　１２－４２
　・引用文献　１，３，２
　本願出願人は上申書において、
（Ｂ－１）カニクイザルが進化学的にヒトと関連性があるとしても、カニクイザルとヒトとでは、多くの点で極めて異なっているのであり、カニクイザルのような種において使用された細胞分化方法が、ヒト細胞においても作動するものであるかどうかは、予測不能なものであり、参考文献１－４に報告されるように、実際、ＰＡ６細胞はニューロンへの分化を強力に誘導するのであり、それゆえに、ＰＡ６細胞はヒトＥＳ細胞がＲＰＥやその他の細胞型へと分化することを阻害したであろうことは明らかである、
（Ｂ－２）引用文献３における細胞は、実は真のカニクイザルＲＰＥ細胞ではなかったかも知れないのであり、もしかすると使用した培養条件によって何らかの非天然型の、原始の及び／又は不安定型の細胞型であったかも知れないし、特に、ＲＰＥ培養は、フィーダー細胞や塩基性ＦＧＦの存在も必要とされない上、塩基性ＦＧＦはＲＰＥ細胞を他の細胞型へとトランスフォームすることが示されている、
（Ｂ－３）引用文献３の方法で得られた色素性細胞はＰａｘ６＋であり、一方でＰａｘ６の発現はＲＰＥ前駆体細胞中には存在することが知られているが、成熟ＲＰＥ細胞には存在していないことが記載されている、
（Ｂ－４）引用文献１には、視覚回復がＲＣＳラット（網膜変性のモデル動物）において達成されたことについては述べているものの、当業者がこのように視覚回復が達成されたことを評価するための詳細な情報については一切提供されておらず、このような情報の欠落はとりわけ引用文献１が主張することの信頼性を傷つけるものである、
　として、上記請求項に係る発明は引用文献１，３，２に対して進歩性を有する旨主張する。
ＰＡ６細胞がヒトＥＳ細胞に対してＲＰＥ細胞への分化能を全く有しないとい

った記載はなされていない。そして、ヒト患者の治療に応用すべく、ヒト以外の動物細胞において得られた分化手法や治療活性に関する知見について、同様の分化能や治療活性を期待し、ヒト由来の細胞に対しても適用することは当業者の通常の創作能力の発揮であるところ、引用文献３においても、サル由来の細胞を用いる理由についてカニクイザルが前臨床研究で広く用いられるためであること（第1580頁右欄第2段落）や、ヒトとカニクイザルとが系統発生学的に密接な関係性を有すること（第1584頁右欄第2段落）が述べられているところである。加えて、引用文献３は、ＰＡ６細胞がカニクイザルＥＳ細胞に対してドーパミン作動性神経への分化作用を有することに加え、その中に色素性上皮細胞に分化するものを新たに見出したことを開示している（Abstract，第1581頁右欄第5段落）のであるから、引用文献３の記載に接した当業者であれば、サルＥＳ細胞に代えてヒトＥＳ細胞に対してＰＡ６細胞を適用した場合においても、神経細胞への分化に加えてＲＰＥ細胞へ分化したものを探索し取得することは、当業者が当然に想起し得る事項であり、このことは、参考文献の記載によって阻害されるものではない。

主張点（Ｂ－２）について検討するに、引用文献３のAbstractにおいて、網膜色素上皮細胞が得られたこと、引用文献１の第1793頁右欄最終行-第1794頁左欄第１段落において、特有蛋白の遺伝子発現からみて、引用される引用文献３記載の色素性細胞がＲＰＥ細胞であることを確認したこと、引用文献１の図4及び引用文献３のFig.5において、6角形細胞の集まりである細胞シートが得られたこと、引用文献１の第1794頁左欄第2段落において、当該ＲＰＥ細胞をラットに移植して視機能が保たれたこと等が具体的に記載されており、これらの特徴からみても、引用文献１，３には、ＥＳ細胞に由来した、真性のＲＰＥ細胞が記載されているというほかなく、「実は真のカニクイザルＲＰＥ細胞ではなかったかも知れないのであり、もしかすると使用した培養条件によって何らかの非天然型の、原始の及び／又は不安定型の細胞型であったかも知れない」といった単なる憶測を述べた主張は当該判断を左右するものではない。そもそも、本願明細書においても、本願発明のｈＥＳ細胞から得たヒトＲＰＥ細胞が、遺伝子発現等において、真に網膜色素から単離された他のヒトＲＰＥ細胞と異なることが開示されており（[0080]）、そのような意味では本願発明の細胞も「真のＲＰＥ細胞」ではないともいえ、本願出願人の主張する「真のＲＰＥ細胞」の意味するところが不明である。

主張点（Ｂ－３）について検討するに、上述の通り、引用文献１，３においては、得られた細胞がＲＰＥ細胞であることを、その理由と共に明確に記載している上、本願出願人の主張するように成熟ＲＰＥ細胞にはＰａｘ６が発現しないことが当業者にとり公知だったのであれば、同文献の記載に接した当業者

であれば、網膜変性治療に用いるためのＲＰＥ細胞を得るべく、前駆細胞であるＰａｘ６＋色素性細胞から、成熟ＲＰＥ細胞、すなわちＰａｘ６－色素性細胞を作成してみる程度のことは、当然に想起することができたものというほかない。

主張点（Ｂ－４）については、上述の通り、引用文献１等において得られた細胞は、その遺伝子発現、形態等からみてＲＰＥ細胞であることが明記されているのであり、実際、ヒト患者に対してもＲＰＥ細胞の移植が行われていたのであるから（例えば引用文献１の第 1793 頁右欄第 3 段落）、引用文献１の記載に接した当業者であれば、視覚回復が達成されたことを評価するための詳細な情報の開示がなくとも、ＲＣＳラットの視覚改善はＲＰＥ細胞によってもたらされたことを十分に認識するものといえる。

したがって、本願出願人の上記主張は採用することができない。

Ｃ．理由２

・請求項　　１－２１，３４－４２

・引用文献　３，２

本願出願人は上申書において、Ｂ項で述べた点に加え、

（Ｃ－１）ヒトＥＳ細胞は個別の細胞として継代することができるのであるから、たとえ当業者が引用文献３の方法をヒト細胞に使用するために改変しようと企図したとしても、敢えてヒトＥＳ細胞の塊を使用するという理由はない上、引用文献３はＰＡ６細胞の分化・誘導活性が「細胞表面上に存在する」ことを開示しているから、たとえ引用文献３の方法がヒト細胞で作動するものであったとしても、当業者がヒト細胞をＰＡ６細胞上で塊として培養しようという動機は生じなかったのであり、むしろ誘導惹起細胞との接触の度合いを増大させるために単一細胞を使用したであろうといえる、

（Ｃ－２）引用文献３は、ＥＳ細胞をＰＡ６間質細胞と接触させて３週間の間培養することのみを開示しているに過ぎないのであり、本願発明のような培養時間を採用することについては一切開示していない、として上記請求項に係る発明は引用文献３，２に対して進歩性を有する旨主張する。

ウス ES 細胞とは異なり､サル ES 細胞は PA6 細胞上ではコロニーを形成しない。ヒト ES 細胞でも同様に低い複製効率が報告されている。したがって、誘導開始のために 10-50 の未分化 ES 細胞塊を播種する必要がある。｣という文章構成からみて、サルやヒトのＥＳ細胞はマウスＥＳ細胞とは異なり低い複製効率を有するものとして共に認識されていたことは明らかである。そして、引用文献３において、サルＥＳ細胞の細胞塊を用いた場合にＰＡ６細胞の分化・誘導活性に基づいてＲＰＥ細胞が得られているのであるから、同文献の記載に接した当

業者は、ヒトＥＳ細胞を用いる場合においても、低いクローン効率を改善すべく、同様に未分化ＥＳ細胞塊の形として播種し、その場合にもＰＡ６細胞の分化・誘導活性を期待することは当然に想起し得る事項である。

　主張点（Ｃ－２）については、細胞培養の際に、培養時間といった条件を適宜設定してみることは、当業者が慣用的に行う技術的事項に過ぎない。

　よって、本願出願人の上記主張は採用することができない。

Ｄ．理由２

・請求項　　１－４２

・引用文献　２－６

　本願出願人は上申書において、

（Ｄ－１）引用文献４は、このような細胞集団からＲＰＥ細胞を特別に取得することができることについては、開示も示唆もしておらず、ＭＥＦフィーダー細胞及びＰＡ６間質インデューサー細胞といった２つの異なるフィーダー細胞型を使用している引用文献３及び４に記載の発明において、細胞を培養する方法をどのようにして組み合わせることができたのかについては、引用文献３及び４の記載からは当業者にとっては一切不明である、

（Ｄ－２）むしろ引用文献３は、ＰＡ６細胞の分化・誘導活性が「細胞表面上に存在している」ことを開示しているのであるから、引用文献３は、多層細胞集団において起こるであろうＥＳ細胞とＰＡ６細胞との接触を減少させることになるであろう方法については、逆教示しているといえる、

（Ｄ－３）引用文献５，６には、当業者が胚様体からＲＰＥ細胞を取得しようと企図しようとした明白な動機付けは一切示されていない、

　として上記請求項に係る発明は引用文献２－６に対して進歩性を有する旨主張する。

　主張点（Ｄ－１）及び（Ｄ－３）について検討するに、研究やヒトへの臨床応用に向けた有用性の検討のために、様々な細胞種の取得を試みることは当業者の通常の創作能力の発揮であるし、網膜色素細胞が疾患の治療に有用でありことも広く知られていたのであるから（引用文献１－３）、引用文献３，６のような公知の分化手法を用いて引用文献４に示されたような胚様体からＲＰＥ細胞を取得してみることは当業者が通常に想起し得る事項である。さらに、引用文献３にはＥＳ細胞をＰＡ６細胞やフィーダー細胞上で培養してＲＰＥ細胞を得ることが開示されているのであるから、引用文献４記載のＥＳ細胞の胚様体をＰＡ６細胞及びフィーダー細胞上で培養すれば、または、引用文献６に示されるようにレチノイン酸処理すれば、ＲＰＥ細胞等が得られるであろうことは当業者が当然に期待する事項である。

主張点（Ｄ－２）については、上述の（Ｃ－１）の主張と同様、引用文献３において、サルＥＳ細胞の細胞塊を用いた場合にＰＡ６細胞の分化・誘導活性に基づいてＲＰＥ細胞が得られているのであるから、同文献の記載に接した当業者は、引用文献４，５に示されたような胚様体（細胞塊）を用いる場合においても、ＰＡ６細胞の分化・誘導活性を期待することは当然に想起し得る事項である。

Ｅ．理由３

・請求項　　１－２１，３４－４２

本願出願人は上申書において、ＲＰＥを形成するために十分となる条件は、特異的な培地というよりはむしろ胚様体又は多層細胞集団として培養する「時間」こそが重要なのであり、特定の培地組成に限定する必要はなく、当業者であれば過度の実験を強いることなく本願発明は実施することができるものである旨主張する。

しかしながら、例えば他の分化因子や分化抑制因子の存在有無によってはＲＰＥ細胞が得られない場合が当然にあり得るように、培地組成のような培養条件等が大きく異なれば、分化後の細胞種も異なり得ることが出願時における技術常識であり、当該事項については、本願出願人も上申書において参考文献１－４を示しつつ「実際、ＰＡ６細胞はニューロンへの分化を強力に誘導するのであり、それゆえに、ＰＡ６細胞はヒトＥＳ細胞がＲＰＥやその他の細胞型へと分化することを阻害したであろうことは明らかであるのです。」などと述べ、ＰＡ６細胞の存在下ではＲＰＥ細胞が得られないことを主張していることや、本願明細書の実施例において「ＭＥＦ培地」、「ｈＥＳ細胞増殖培地」、「誘導培地」、「ＥＢ培地」、「ＲＰＥ培地」等の組成の異なる培地を各工程において明確に区別して用いている（[0070]等）ことからも明らかである。
070]）を用いつつ、過剰増殖により多層を形成させ、または胚様体を形成させた後、その状態のまま、外来分化因子をさらに添加することなく、6 週間以上培養することにより、色素性細胞を取得し、培養することでＲＰＥ細胞を取得したことが具体的に開示されるにとどまるのであるから、上述のような発明の詳細な説明の記載、及び、出願時の技術常識を考慮すると、発明の詳細な説明における、上述の特定条件下でＲＰＥ細胞を取得した旨の開示内容からは、単に（ａ）～（ｃ）ステップを含むことのみが規定され、他の分化因子や分化抑制因子の存在をも包含し、また、様々な培養培地を用いることを包含する本願上記請求項に係る発明まで、拡張ないし一般化することはできない。

加えて、本願出願人は、様々な培養培地を用いた場合でもＲＰＥ細胞を取得可能であって「時間」が重要である旨を、本願出願時以降に発行された刊行物

の記載を根拠としてさらに主張しているが、それはすなわち、様々な培養培地においてＲＰＥ細胞の取得が可能であることが本願出願後において初めて確認されたというだけであり、出願時の技術常識に照らして本願明細書を検討した場合には、特定の培養条件が具体的に開示されるのみであり、上述の通り様々な培養培地においてもＲＰＥ細胞を取得可能であるとは認められなかったのであるから、そのような出願後に発行された刊行物の記載をもって、本願明細書において培養培地に依らず「時間」こそが重要であることが開示されていたものと認めることはできない。

さらに、出願人は明細書の実施例５において、「確実に高収量のＲＰＥ様細胞が得られる分化培養系の最適化段階的な添加を含めて、ｂＦＧＦ、インスリン、ＴＧＦ－β、ＩＢＭＸ、ｂｍｐ－２、ｂｍｐ－４又はその組合せの存在下で、フィーダー細胞上で又は胚葉体（ＥＢ）としてＥＳ細胞を培養する。或いは、ＲＰＥ形成におけるＥＣＭの役割を評価する際に、様々な細胞外マトリックス被覆プレート（ラミニン、フィブロネクチン、コラーゲンＩ、コラーゲンＩＶ、マトリゲル（Ｍａｔｒｉｇｅｌ）など）上でＥＳ細胞を増殖させる。初期ＲＰＥ前駆体の分子マーカー（Ｐａｘ６、Ｐａｘ２、ｍｉｔｆ）及びＲＰＥ細胞の分子マーカー（ＣＲＡＬＢＰ、ベストロフィン、ＰＥＤＦ、ＲＥＰ６５）の発現を、種々の時間間隔でリアルタイムＲＴ－ＰＣＲにより評価して、上記で述べた作用物質の組合せの成功、及びＲＰＥ様細胞又はその前駆体を濃縮する段階的な手順を検証し判定する。この手法を用いて、ＲＰＥと、光受容体や神経網膜など他の眼組織との共通前駆体を生成することもでき、それを単離し、その分化潜在性についてさらに特徴付け、移植試験で用いることができる。」（【0061】段落）と主張している。

また、例えば、請求項７の発明特定事項が、「ステップ（ｂ）における前記培養が、前記ｈＥＳ細胞を、外来的に添加された塩基性ＦＧＦを欠き、外来的に添加されたＬＩＦを欠きかつ外来的に添加されたプラズマネート（Ｐｌａｓｍａｎａｔｅ）を欠く培地中で培養すること」を含むことから、請求項７が引用する請求項１～６は「外来的に添加された塩基性ＦＧＦを欠き、外来的に添加されたＬＩＦを欠きかつ外来的に添加されたプラズマネート（Ｐｌａｓｍａｎａｔｅ）を欠く培地」でない培地をその態様として包含することは明らかである。

したがって、請求項１等の培地の組成について何ら限定されていない発明については、塩基性ＦＧＦ等を含む様々な作用物質を培地に添加することを態様として含んでいることは明らかである。

少なくとも、出願人が、上申書において、「塩基性ＦＧＦはＲＰＥ細胞を他の細胞型へとトランスフォームすることが示されていたのであります（前回意見

書に添付の参考資料２（Ｊｅａｎ　ｅｔ　ａｌ.）を参照)。」と主張していることを勘案すれば、本願特許請求の範囲には、当業者がその出願時の技術常識に照らし、ヒトＲＰＥ細胞を取得するという課題を解決できると認識できる範囲を超えた部分が包含されているといわざるを得ず、出願人の主張は請求項の記載に基づくものとはいえない。
よって、本願出願人の上記主張は採用することができない。

Ｆ．理由４
・請求項　　１－２１，３４－４２
本願出願人は上申書において、本願明細書の記載に照らせば、「自発的に」との用語は特別な増殖因子の添加、インデューサー細胞への曝露、又は他の外因的薬剤を一切必要とすることなく、例示された方法を使用してＲＰＥ細胞が産生されたことを述べているものであり、十分に明確である旨主張する。
しかしながら、「自発的に」なる用語について上述のような意味を有することが、本願明細書において定義されているものではない。また、ＲＰＥ細胞への分化には本願請求項１における（ａ），（ｂ），（ｃ）ステップとして記載される処理を行う必要があると認められるところ、このような特定の処理を施すことは、一般な「自発的」という用語の意味に含まれないことは明らかであるから、依然として「自発的な」という記載により表される具体的方法が明らかでない。
よって、本願出願人の上記主張は採用することができない。
についても留意されたい。
平成２３年６月１日付け及び平成２４年２月２７日付けでした手続補正により、請求項１～３及び請求項２５～２７並びに請求項１～３及び請求項２５～２７を引用する各請求項に係る発明は、「茶色色素を細胞質中に分散させて含んでいる色素性細胞の外観となるのに十分な時間で培養するステップ」を発明特定事項とするものに補正されたこととなる。
そして、出願当初の明細書には、「茶色色素を細胞質中に分散させて含んでいる色素性細胞の外観となるのに十分な時間」についての明示的な記載或いはそれに類する記載は存在しない。
出願人は、平成２３年６月１日付け意見書で、「段落［００５１］には、「細胞の厚い多層」を培養し、「細胞質中に茶色の色素を」有する「細胞の暗色の」の外観となるのに十分な時間で培養することがサポートされています。また、「胚様体」については、段落［００５２］に「胚様体（ＥＢ)」を「色素上皮細胞」が出現するのに十分な時間で培養することがサポートされています。」と主張している。
しかしながら、当該記載は、「ＬＩＦ、ＦＧＦ及びプラズマネート（Ｐｌａｓ

ｍａｎａｔｅ）の不在下で、ＭＥＦ上でｈＥＳ細胞培養物を過剰増殖させたと、それは細胞の厚い多層を形成する。約６週間後、細胞の暗色の島が大きな集団内に現れる（図１）。」（【００５１】段落）、「ｈＥＳ細胞が胚葉体（ＥＢ）を形成したとき、色素上皮細胞が最初の６～８週間中にＥＢの約１～２％に現れる（図１Ｂ）。」（【００５２】段落）というものであって、いずれも６週間後に「茶色色素を細胞質中に分散させて含んでいる色素性細胞の外観となる」ことをいうにすぎず、６週間後以外に、「茶色色素を細胞質中に分散させて含んでいる色素性細胞の外観となるのに十分な時間」という技術的事項が存在することを示すものではない。

また、例えば、請求項８の発明特定事項が、「ステップ（ｂ）における培養の持続時間が、少なくとも６週間である」ことを含むことから、請求項８が引用する請求項１～７は「外培養の持続時間が、少なくとも６週間」より短い時間をその態様として包含することは明らかである。

そうすると、上記手続補正は、これら「茶色色素を細胞質中に分散させて含んでいる色素性細胞の外観となる」時間に係る事項を「６週間後」から「十分な時間」として任意的、選択的事項とすることによって、本願出願時には明らかでなかった技術的事項である「茶色色素を細胞質中に分散させて含んでいる色素性細胞の外観となる」時間として「６週間後」より例えば早い時間でも十分である場合があるという新たな技術的事項を、本願当初明細書に開示された技術的事項に付加したものであることは明らかである。

よって、仮に上記手続補正に係る発明の記載根拠をこれら記載事項に求めたとしても、上記手続補正に係る発明は、当業者によって本願明細書のすべての記載を総合することにより導かれる技術的事項との関係において、新たな技術的事項を導入したものであることが明らかであるということができる。

４－６　ＡＣＴ社の米国特許登録７７３６８９６の審査経過

本登録特許（発明の名称「Methods for producing enriched population of human retinal pigment epithelium cells」）はＡＣＴ社の網膜再生医療関係の特許出願の基本特許となるもので、米国出願１１／１８６７２０（出願日２００５年７月２０日、優先権主張日２００４年１月２３日）に基づくものである。パテントファミリーとしては国際出願等のＰＣＴ／ＵＳ２００５／００２２７３，ＷＯ２００５／０７００１１，日本特許出願２００６－５５１３９２等を主体に、多くの主要国に出願されている。

４－６－１　審査の時系列

審査の経過を以下に示す。

２００５年０７月２０日:出願
２００５年１０月１８日：明細書の補正
２００８年０２月２７日：特許請求の範囲の補正
２００８年０７月０２日：拒絶理由の通知（Non-Final Rejection）
２００８年１１月１７日：審査官インタビューサマリー
２００８年１２月０４日：意見書、特許請求の範囲の補正書の提出
２００９年０２年０３日：最後の拒絶理由の通知（Final Rejection）
２００９年０６月２９日：意見書、特許請求の範囲の補正書の提出
２００９年０８月０５日：拒絶理由の通知（Non-Final Rejection）
２００９年０８月１７日：情報開示陳述書（ＩＤＳ）の提出
２０１０年０１月２０日：審査官インタビューサマリー
２０１０年０２月０４日：ＩＤＳ、意見書、特許の請求の範囲の補正書の提出
２０１０年０３月２４日：特許査定（ＮＯＡ）
２０１０年０４月２０日：意見書、特許請求の範囲の補正書の提出
２０１０年０４月３０日：審査官の指導による補正
２０１０年０５月０３日：特許請求の範囲の補正
２０１０年０５年２６日：特許登録通知

４－６－２　出願時の特許請求の範囲

以下に出願時の特許の請求の範囲を示す。

1. A method of treating or preventing retinal degeneration, comprising use of a cell selected from the group consisting of at least one of: RPE cells, RPE-like cells, RPE or RPE-like progenitors derived from mammalian embryonic stem cells.
2. The method of claim 1, wherein the condition of retinal degeneration is selected from the group consisting of at least one of: retinitis pigmentosa and macular degeneration.
3. The method of claim 1, further comprising transplantation of the cell by vitrectomy surgery into the subretinal space of the eye.
4. The method of claim 3, wherein the cells are transplanted in a suspension, matrix, or substrate.
5. The method of claim 2, wherein the retinitis pigmentosa is associated with an animal model.
6. The method of claim 5, wherein the animal model is selected from the group consisting of: rd mouse, RPE-65 knockout mouse, tubby-like mouse,

RCS rat, Abyssinian cat, cone degeneration "cd" dog, progressive rod-cone degeneration "prcd" dog, early retinal degeneration "erd" dog, rod-cone dysplasia 1, 2 & 3 "rcd1, rcd2 and rcd3" dogs, photoreceptor dysplasia "pd" dog, and Briard "RPE-65" dog.
7. The method of claim 6, wherein the outcome of the therapy in the animal model is evaluated using one or more of behavioral tests, fluorescent angiography, histology, and functional testing such as measuring the ability of the cells to perform phagocytosis (photoreceptor fragments), vitamin A metabolism, tight junctions conductivity, or evaluation using electron microscopy.
8. A method for the spontaneous differentiation of hES cells or embryoid bodies into RPE cells, RPE-like cells, or RPE progenitor cells, said method comprising: a) allowing hES cell cultures to overgrow on MEF; b) allowing the hES cell cultures to form a thick multilayer of cells; c) culturing the hES cells; d) isolating and culturing the pigmented RPE, RPE-like, and/or RPE progenitor cells from the resultant cell cultures.
9. The method of claim 8, wherein the isolating and culturing of PRE-like cells in step d comprises: a) digesting the cultured hES cells or embryoid bodies with an enzyme; b) selectively isolating the pigmented cells; c) plating the isolated cells on gelatin or laminin for 1-2 days to form primary cultures (P0); d) continued culturing the primary culture for a period of up to 3 weeks; and, e) isolating the RPE-like cells.
10. The method of claim 9, wherein the enzyme is selected from the group consisting of one or more of trypsin, collagenase, and dispase.
11. The method of claim 8, wherein the RPE cells are grown to establish a new RPE cell line.
12. The method of claim 11, wherein the RPE cell line is differentiated into alternate lineages comprising treatment of the RPE cell line in culture with bFGF or FGF.
13. The method of claim 11, wherein the new RPE cell lines varies from the already established RPE cell lines in at least one of the characteristics selected from the group consisting of: growth rate, expression of pigment, de-differentiation in culture, and re-differentiation in culture, of RPE-like cells when they are derived from different ES cell lines.
14. A method for the derivation of RPE lines or precursors to RPE cells that have an increased ability to prevent neovascularization, said method

comprising: a) aging a somatic cell from an animal such that telomerase is shortened wherein at least 10% of the normal replicative lifespan of the cell has been passed; and, b) using the somatic cell as a nuclear transfer donor cell to create cells that overexpress angiogenesis inhibitors, wherein the angiogenesis inhibitors can be Pigment Epithelium Derived Factor (PEDF/EPC-1).

15. The method of claim 14, wherein the somatic cells are genetically modified with exogenous genes that inhibit neovascularization.

16. The method of claim 8, wherein the RPE-like cells are derived from a bank of ES or embryo-derived cells with homozygosity in the HLA region such that ES-derived cells have reduced complexity of their HLA antigens.

17. The method of claim 8, wherein the ES cells are derived from a human.

18. A method for the treatment of Parkinson's disease comprising the transplantation of RPE-like cells or progenitor cells.

19. A method for isolating RPE-like cells comprising: a) culturing hES cells in medium that supports proliferation and transdifferentiation of hES cells to RPE-like cells; b) selecting the cells of step a) that exhibit the signs of differentiation along the neural lineage; c) passaging the cells selected in step b) using an enzyme selected from the group consisting of trypsin, collagenase IV, collagenase I, and dispase until pigmented epithelial islands appear or multiply in number; and d) selecting pigmented or non-pigmented cells passaged in step c) for establishment of high purity RPE-like cultures.

20. The method of claim 19 wherein the passaging of cells in step c) is repeated at least twice.

21. The method of claim 19 wherein the selection of cells in step b) is a selection of cells that express a nestin or Pax6 neural lineage-specific marker.

22. The method of claim 19, wherein said medium contains Serum Replacement.

23. The method of claim 22, wherein said medium comprises knockout high glucose DMEM supplemented with 500 u/ml Penicillin, 500 .mu.g/ml streptomycin, 1% non-essential amino acids solution, 2 mM GlutaMAX I, 0.1 mM beta-mercaptoethanol, 4-80 ng/ml bFGF, and 8.4%-20% Serum Replacement.

24. The method of claim 23, wherein said medium further comprises 10-100 ng/ml human LIF.

25. The method of claim 23, wherein said medium further comprises Plasmanate.

26. An isolated RPE or RPE-like cell line which varies from established RPE cell lines in at least one of the characteristics selected from the group consisting of growth rate, expression of pigment, de-differentiation in culture, and re-differentiation in culture.

４－６－３　拒絶理由（Ｎｏｎ　Ｆｉｎａｌ　Ｒｅｊｅｃｔｉｏｎ）

発明の単一性違反（Ｅｌｅｃｔｉｏｎ／Ｒｅｓｔｒｉｃｔｉｏｎにより請求項１９－２５のみを審査対象とする。）、第１２２条第１パラグラフ（開示要件、実施要件、ベストモード）違反、及び第１０３条（新規性及び非自明性）違反の拒絶理由が通知された。

このうち、特に重要な先行技術であるKawasakiらとThomsonらの文献等に基づく第１０３条違反の拒絶理由の全文を以下に掲示する。

Claim Rejections - 35 USC § 103

The following is a quotation of 35 U.S.C. 103(a) which forms the basis for all obviousness rejections set forth in this Office action:

(a) A patent may not be obtained though the invention is not identically disclosed or described as set forth in section 102 of this title, if the differences between the subject matter sought to be patented and the prior art are such that the subject matter as a whole would have been obvious at the time the invention was made to a person having ordinary skill in the art to which said subject matter pertains. Patentability shall not be negatived by the manner in which the invention was made.

Claims 19, 20 and 22 are rejected under 35 U.S.C. 103(a) as being unpatentable over Kawasaki *et al.* (**PNAS**, 99(3): 1580-1585, February 5, 2002) when taken with Thomson *et al.* (**Science**, 282: 1145-1148, November 6, 1998).

The breadth of the claims encompass culturing hES cells under any condition to provide RPE-like cells. Thus, the combination of the cited art is proper because it provides conditions that result in RPE-like cells.

Kawasaki teach culturing monkey ES cell lines with PA6 cells to produce RPE cells.

With regard to step (c) of claim 19, although Kawasaki teach mechanically isolating pigmented epithelium patches (p. 1581, col. 2, Culture of Pigmented Epithelium), they also teach methods of dissociating by trypsin (p. 1581, col. 2, Sorting Neural Cells), and these methods would be well-known to the skilled artisan to employ in isolating pigmented epithelial cells.

With regard to the limitation in claim 20, Kawasaki teach that the pigmented cells could be replated at least twice (p. 1581, col. 2, Culture of Pigmented Epithelium).

With regard to the limitation in claim 22, Kawasaki teach that the cells were cultured in 10% knockout serum replacement (p. 1581, col. 1, 1st ¶).

Kawasaki do not specifically teach using their methods for human ES cells. However, prior to the time of the claimed invention, Thomson teach the generation of human ES cells and suggest the need in the art for directing the differentiation of hES cells to cell types of interest. See p. 1146, col. 3, last ¶.

Accordingly, in view of the combined art, it would have been obvious for one of ordinary skill in the art, to modify the techniques, as taught by Kawasaki, to produce human RPE cells from human ES cells, with a reasonable expectation of success. One of ordinary skill in the art would have been motivated to make this modification in view of Thomson's suggestion of the art-recognized need to produce large, purified populations of differentiated cells for drug discovery and therapeutic purposes (see p. 1147, col. 1) and Kawasaki's suggesting that the availability of primate pigmented epithelia, generated *in vitro* should facilitate the pathogenic and therapeutic studies of retinal diseases (p. 1584, col. 1, 2nd ¶).

４－６－４　意見書

実施要件違反並びに開示要件違反に関しては、ＲＰＥ細胞等を特定するマーカー、ＲＰＥ６５＋，ベストロフィン＋、Ｐａｘ－を明確にする補正を行ったことで解消できることの旨主張した。第１０３条の非自明性に関しては、Kawasaki らのものと、次の２点で異なること主張した。一つ目は分化誘導の方法において、本願発明の方法と kawasaki らの方法において用いる材料化学的に異なること、二つ目は、本願発明の方法で製造したＲＰＥ細胞タイプが Kawasaki らの方法で製造したＲＰＥ細胞と物質的に異なることである。

まず、方法の差異について論ずるに、Kawasaki らの方法は直接的分化法であり、ＥＳ細胞を分化誘導する活性（ＳＤＩＡ）を有するＰＡ６細胞と共培養する方法であるが、本願請求項１９記載の方法はヒトＥＳ細胞を自発的に色素上皮細胞に分化する方法である。従って、Kawasaki らの方法等開示からでは本願請求項１９を予想することは出来ず、引用文献等から自明性を賦与できない。

次に、本願方法と Kawasaki らの方法で産生したＲＰＥ細胞の差異の点において論ずるに、Kawasaki らの方法で産生したＲＰＥ細胞に関して、本願請求項１９と相同するＲＰＥ６５＋，ベストロフィン+Ｐａｘ－色素上皮細胞である証拠

がない。Kawasaki らは霊長類ＥＳ細胞からの色素上皮細胞のオプティック・カップ　マーカーＰａｘ６は一貫として陽性（＋）であると記述している。従って、Thomson らと Kawasaki らの引用文献を併せても本願請求項１９記載のＲＰＥ細胞を産生しない。よって、本願請求項１９は非自明性を有すると主張する。
　以下に、上記の第１０３条に関する英文の全文を掲示する。

We first discuss the differences between the claimed methods and the methods performed by Kawasaki *et al.* Kawasaki *et al.* teach a method of *directed* differentiation. They co-culture ES cells with PA6 cells, which express SDIA (stromal cell-derived inducing activity) (see Abstract). Claim 19 is drawn to a method involving "*spontaneous* differentiation of hES cells to pigmented epithelial cells". Since the combined publications do not anticipate every limitation of claim 19, claim 19 and its dependent claims are not rendered obvious by the cited publications.

Next, we turn to the differences between the cells produced by the claimed methods and the cells produced by Kawasaki *et al.* There is no indication that the method of Kawasaki *et al.* produced non-human RPE65+ bestrophin+ Pax6- pigmented epithelial cells similar to the cells produced by claim 19. Kawasaki *et al.* state, "Consistently, pigmented epithelial cells from primate ES cells were positive for the optic cup marker Pax6" (page 1584, column 1). As the instant specification states, substantial Pax6 expression is characteristic of early RPE progenitors rather than mature RPE or RPE-like cells: "Pax6 at earlier stages acts as an activator of proneural genes and is *downregulated* in the RPE in further development." (paragraph 63; emphasis added). In contrast to Kawasaki *et al.*, claim 19 requires that the RPE-like culture comprise "RPE65+

bestrophin+ Pax6- pigmented epithelial cells." Thus, the cells of Kawasaki *et al.* are not the equivalents of the cells of claim 19. Consequently, one of skill in the art, attempting to combine Thompson *et al.* and Kawasaki *et al.*, would not have produced the cells described in claim 19 and would thus not have arrived at the method recited in claim 19. Well-differentiated cells are clearly preferable to partially-differentiated cells in certain applications, such as therapeutic transplantations. In conclusion, claim 19 is non-obvious in view of Kawasaki *et al.* and Thompson *et al.*

Based on the above arguments and amendments, at least one of the legal requirements to establish a *prima facie* case of obviousness is not met. Reconsideration and withdrawal of this rejection on ground of 35 USC 103(a) is respectfully requested.

４－６－５　補正

　請求項１－１８を削除、請求項１９をＲＰＥ６５＋ベストロフィン+Ｐａｘ−色素上皮細胞をエンリッチにする細胞製造法と限縮補正、請求項２７及び２８

の追加補正をした。

４－６－６　最後の拒絶理由（Ｆｉｎａｌ　Ｒｅｊｅｃｔｉｏｎ）

発明の単一性違反、第１１２条違反、ただし、先の拒絶理由で挙げた第１０３条違反は撤回する。その理由として、本願請求項１９，２０、及び２２は、引用文献等とは特定のステップ（工程）に関し相違が有り、かつKawasaki らが開示した単離した細胞はＰａｘ６が陽性である事実に関し相違があることによる。

なお、結論として総ての請求項を拒絶する。

４－６－７　補正

請求項１９，２７及び８においてＲＰＥ６５＋の削除、請求項２７からＰＥＤＦ＋の削除、新たに請求項２９及び３０の追加補正をした。下記に、英文の全文を掲示する。

1-18. (Canceled)

19. (Currently Amended) A method for producing a population of cells enriched for [[RPE65+]] bestrophin+ Pax6- pigmented epithelial cells comprising:

a) culturing hES cells in medium that supports spontaneous differentiation of hES cells to pigmented epithelial cells;

b) selecting the cells of step a) that exhibit pigmented epithelial morphology;

c) passaging, for a sufficient time or number passages, the cells selected in step b) using an enzyme selected from the group consisting of trypsin, collagenase IV, collagenase I, and dispase, to enrich for [[RPE65+]] bestrophin+ Pax6- pigmented epithelial cells.

20. (Previously presented) The method of Claim 19 wherein the passaging of cells in step c) is repeated at least twice.

26. (Canceled)

27. (Currently Amended) The method of claim 19, wherein the [[RPE65+]] bestrophin+ Pax6- pigmented epithelial cells are enriched for CRALBP+ cells [[and PEDF+]].

28. (Currently Amended) The method of claim 19, wherein the [[RPE65+]] bestrophin+ Pax6- pigmented epithelial cells have an absence of at least one ES cell marker selected from the group consisting of Oct4 or Sox2.

29. (New) The method of claim 19, wherein the bestrophin+ Pax6- pigmented epithelial cells are enriched for PEDF+ cells.

30. (New) The method of claim 19, wherein the bestrophin+ Pax6- pigmented epithelial cells are enriched for RPE65+ cells.

４－６－８　意見書

上記補正で拒絶理由が解消した旨主張する。

４－６－９　拒絶理由（Ｎｏｎ　Ｆｉｎａｌ　Ｒｅｊｅｃｔｉｏｎ）

補正後の請求項１９－２５及び２７－３０は第１１２条第１パラグラフ違反、請求項２３－２５は第１１２条第２パラグラフ違反で認められない。また、請求項１９－２３は特許出願Ｎｏ．１１／４９０９５３の請求項８－１３とダブルパテント違反である。

４－６－１０　補正及び意見書等

請求項１－３０を削除して新たに請求項３１－７０を設ける（ただし、ここでは補正の詳細は割愛する）。その後、審査官とのやり取りで、補正を行い、最終的には、審査官の指導に基づく補正を行い、特許登録査定に至った。

４－６－１１　特許登録の特許請求の範囲

以下に、特許登録された請求項の英文の全文を掲示する。

1. A method for producing an enriched population of human retinal pigment epithelium (RPE) cells, the method comprising: (a) providing a multilayer population of human embryonic stem (hES) cells; (b) culturing said multilayer population of hES cells under conditions that do not maintain the undifferentiated state of said hES cells for a sufficient time to allow for the appearance of putative human RPE cells, wherein said putative human RPE cells comprise brown pigment dispersed within their cytoplasm; (c)

selecting one or more of said putative human RPE cells from the culture of step (b) to obtain human RPE cells; and (d) culturing said human RPE cells obtained_in step (c) to form a cell monolayer containing cells that are Pax6- and bestrophin+ and exhibit a characteristic cobblestone, polygonal, epithelial-like appearance and comprise brown pigment dispersed within their cytoplasm, thereby producing an enriched population of human RPE cells.

2. The method of claim 1, wherein said culturing in step (b) comprises culturing the multilayer population of hES cells in media lacking exogenously added FGF.

3. The method of claim 1, wherein said culturing in step (b) comprises culturing the multilayer population of hES cells in media lacking exogenously added FGF and lacking exogenously added LIF.

4. The method of claim 1, wherein said culturing in step (b) comprises culturing the hES cells in media lacking exogenously added FGF and lacking exogenously added LIF and lacking exogenously added PLASMANATE.RTM..

5. The method of claim 1, wherein the duration of culturing in step (b) is about 6 weeks.

6. The method of claim 1, wherein the duration of culturing in step (b) is between about 6 weeks and about 8 weeks.

7. The method of claim 1, wherein the duration of culturing in step (b) is between about 3 months and about 5 months.

8. The method of claim 1, wherein the cell monolayer of step (d) contains cells that are Pax6-, bestrophin+, CRALBP+, PEDF+, and express RPE65.

9. The method of claim 1, wherein the cell monolayer of step (d) contains cells that are Pax6-, bestrophin+, CRALBP+, PEDF+, and express RPE65, and have the absence of at least one ES cell marker selected from the group consisting of Oct4 and Sox2.

10. The method of claim 1, wherein prior to step (b) said multilayer population of hES cells are cultured in the presence of exogenously added FGF and a fibroblast feeder layer.

11. The method of claim 1, wherein prior to step (b) said multilayer population of hES cells are cultured the presence of exogenously added FGF and LIF and a fibroblast feeder layer.

12. The method of claim 1, wherein prior to step (b) said multilayer population of hES cells are cultured the presence of exogenously added FGF,

PLASMANATE.RTM. and a fibroblast feeder layer.
13. A method for producing an enriched population of human retinal pigment epithelium (RPE) cells, the method comprising: (a) providing a culture of human ES (hES) cells; (b) culturing the hES cells to produce one or more embryoid bodies; (c) culturing said one or more embryoid bodies for a sufficient time for the appearance of putative human RPE cells within at least one of said one or more embryoid bodies, wherein said putative human RPE cells comprise brown pigment dispersed within their cytoplasm, whereby one or more embryoid bodies containing putative human RPE cells are formed; (d) selecting and dissociating one or more of said embryoid bodies containing putative human RPE cells from the culture of step (c) to obtain human RPE cells; and (e) culturing said human RPE cells obtained in step (d) to form a cell monolayer containing cells that are Pax6- and bestrophin+ and exhibit a characteristic cobblestone, polygonal, epithelial-like appearance and comprise brown pigment dispersed within their cytoplasm, thereby producing an enriched population of human RPE cells.
14. The method of claim 13, wherein the culturing of one of more embryoid bodies in step (c) comprises culturing the embryoid bodies in media lacking exogenously added FGF.
15. The method of claim 13, wherein the culturing of one of more embryoid bodies in step (c) comprises culturing the embryoid bodies in media lacking exogenously added FGF and lacking exogenously added LIF.
16. The method of claim 13, wherein the culturing of one or more embryoid bodies in step (c) comprises culturing the embryoid bodies in media lacking exogenously added FGF and lacking exogenously added LIF and lacking exogenously added PLASMANATE.RTM..
17. The method of claim 13, wherein the duration of culturing in step (c) is about 6 weeks.
18. The method of claim 13, wherein the duration of culturing in step (c) is between about 6 weeks and about 8 weeks.
19. The method of claim 13, wherein the duration of culturing in step (c) is between about 3 months and about 5 months.
20. The method of claim 13, wherein the cell monolayer of step (e) contains cells that are Pax6-, bestrophin+, CRALBP+, PEDF+, and express RPE65.
21. The method of claim 13, wherein the cell monolayer of step (e) contains cells that are Pax6-, bestrophin+, CRALBP+, PEDF+, and express RPE65, and

have the absence of at least one ES cell marker selected from the group consisting of Oct4 and Sox2.
22. A method for producing an enriched population of human retinal pigment epithelium (RPE) cells, the method comprising: (a) providing a multilayer population of human embryonic stem (hES) cells, wherein said multilayer population of hES cells have been cultured in media containing exogenously added FGF and a fibroblast feeder layer; (b) culturing said multilayer population of hES cells under conditions that do not maintain the undifferentiated state of said hES cells for a sufficient time for the appearance of putative human RPE cells, wherein said putative human RPE cells comprise brown pigment dispersed within their cytoplasm, wherein said conditions that do not maintain the undifferentiated state of said hES cells comprise media lacking exogenously added FGF and the duration of culturing is at least 6 weeks; (c) selecting one or more of said putative human RPE cells from the culture of step (b) to obtain human RPE cells; and (d) culturing said human RPE cells selected in step (c) to form a cell monolayer containing cells that are Pax6-, bestrophin+, CRALBP+, PEDF+, and express RPE65, have the absence of at least one ES cell marker selected from the group consisting of Oct4 and Sox2, and exhibit a characteristic cobblestone, polygonal, epithelial-like appearance and comprise brown pigment dispersed within their cytoplasm, wherein during said culturing the cultured cells temporarily lose their epithelial appearance and pigmentation after plating, and then regain their epithelial appearance and pigmentation upon further culturing, thereby producing an enriched population of human RPE cells.
23. The method of claim 22, wherein said culturing in step (b) comprises culturing the multilayer population of hES cells in media lacking exogenously added FGF and lacking exogenously added LIF.
24. The method of claim 22, wherein said culturing in step (b) comprises culturing the multilayer population of hES cells in media lacking exogenously added FGF and lacking exogenously added LIF and lacking exogenously added PLASMANATE.RTM..
25. The method of claim 22, wherein the duration of culturing in step (b) is between about 6 weeks and about 8 weeks.
26. The method of claim 22, wherein the duration of culturing in step (b) is between about 3 months and about 5 months.

27. The method of claim 22, wherein said media containing exogenously added FGF in step (a) further comprises exogenously added LIF.
28. The method of claim 22, wherein said media containing exogenously added FGF in step (a) further comprises exogenously added PLASMANATE.RTM..
29. A method for producing an enriched population of human retinal pigment epithelium (RPE) cells, the method comprising: (a) providing a culture of human embryonic stem (hES) cells; (b) culturing the hES cells to produce one or more embryoid bodies, wherein said one or more embryoid bodies or the cells from which said one or more embryoid bodies are formed have been cultured in media containing exogenously added FGF; (c) culturing said one or more embryoid bodies for a sufficient time for the appearance of putative human RPE cells within at least one of said one or more embryoid bodies, wherein said putative human RPE cells comprise brown pigment dispersed within their cytoplasm, wherein the one or more embryoid bodies are cultured in a media lacking exogenously added FGF, and the duration of culturing is at least 6 weeks, whereby one or more embryoid bodies containing putative human RPE cells are formed; (d) selecting and dissociating one or more of said embryoid bodies containing putative human RPE cells from the culture of step (c) to obtain human RPE cells; and (e) culturing said human RPE cells obtained in step (d) to form a cell monolayer containing cells that are Pax6-, bestrophin+, CRALBP+, PEDF+, and express RPE65, have the absence of at least one ES cell marker selected from the group consisting of Oct4 and Sox2, and exhibit a characteristic cobblestone, polygonal, epithelial-like appearance and comprise brown pigment dispersed within their cytoplasm, wherein during said culturing the cultured cells temporarily lose their epithelial appearance and pigmentation after plating, and then regain their epithelial appearance and pigmentation upon further culturing, thereby producing an enriched population of human RPE cells.
30. The method of claim 29, wherein said culturing in step (c) comprises culturing the embryoid bodies in media lacking exogenously added FGF and lacking exogenously added LIF.
31. The method of claim 29, wherein said culturing in step (c) comprises culturing the embryoid bodies in media lacking exogenously added FGF and lacking exogenously added LIF and lacking exogenously added PLASMANATE.RTM..

32. The method of claim 29, wherein the duration of culturing in step (c) is between about 6 weeks and about 8 weeks.
33. The method of claim 29, wherein the duration of culturing in step (c) is between about 3 months and about 5 months.
34. The method of claim 29, wherein said media containing exogenously added FGF in step (b) further comprises exogenously added LIF.
35. The method of claim 29, wherein said media containing exogenously added FGF in step (b) further comprises exogenously added PLASMANATE.RTM..

４－６－１２　審査における引用文献等

U.S. Patent Documents
6642048 November 2003 Xu et al.
7247479 July 2007 Kochanek et al.
2002/0022268 February 2002 Xu et al.
2003/0087859 May 2003 Kochanek et al.
2004/0018617 January 2004 Hwang et al.
2006/0031951 February 2006 Klimanskaya
2007/0031386 February 2007 Klimanskaya
Foreign Patent Documents
WO-98/30679 Jul., 1998 WO

Other References
Gepstein. Cir. Res., 91: 866-876, 2002. cited by examiner .
Motohashi. Pigment Cell Res., 19: 284-289, 2006. cited by examiner .
Zhou. Genome Res., 12: 1716-1722, 2002, Abstract. cited by examiner .
Kawasaki et al. PNAS, 99(3): 1580-1585, Feb. 5, 2002. cited by examiner .
Thomson et al. Science, 282: 1145-1147, Nov. 6, 1998. cited by examiner .
Plasmanate.RTM. product information. Accessed online at http://www.bdipharma.com/Products-Albumin-Plasmanate-PPF.aspx on Mar. 19, 2010. cited by examiner .
Hori et al., Growth inhibitors promote differentation of insulin-producing tissue from embryonic stem cells. PNAS vol. 99. No. 25 pp. 16105-116110 (2002). cited by other .
Lu et al., Generation of functional hemangioblasts from human embryonic stem cells. Nature Methods vol. 4, No. 6, pp. 501-509 (2007). cited by other .

Ohno-Matsui et al., In vitro and in vivo characterization of iris pigment epithelial cells cultured on amniotic membranes. Molecular Vision vol. 12 pp. 1022-1032 (2006). cited by other .
Hirano, M. et al., "Generation of Structures Formed by Lens and Retinal Cells Differentiating From Embryonic Stem Cells," Developmental Dynamics, Wiley-Liss, Inc., New York, NY, vol. 228, No. 4, Dec. 2003, pp. 664-671. cited by other .
Ooto, S., et al., "Induction of the Differentiation of Lentoids from Primate Embryonic Stem Cells," Investigative Opthamology & Visual Science, Association for Research in Vision and Opthamology, vol. 44, No. 6, Jun. 2003, pp. 2689-2693. cited by other .
Zhao, X., et al. "Differentiation of Embryonic Stem Cells Into Retinal Neurons," Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 297, No. 2, Sep. 2002, pp. 177-184. cited by other .
Ying, Q.-L., et al. "Conversion of Embryonic Stem Cells Into Neuroctodermal Precursors in Adherent Monoculture," Nature Biotechnology, Nature Publishing Group, New York, NY, vol. 21, No. 2, Feb. 2003, pp. 183-186. cited by other .
Reubinoff, B., et al., "Embryonic Stem Cell Lines From Human Blastocysts: Somatic Differentiation In Vitro," Nature Biotechnology, Nature Publishing Group, New York, NY, vol. 18, No. 4, Apr. 2000, pp. 399-404. cited by other .
Lund, R. D., et al. "Cell Transplantation As A Treatment for Retinal Disease," Progress in Retinal and Eye Research, vol. 20, No. 4, Jul. 2001, pp. 415-449. cited by other .
Supplementary European Search Report, In application No. EP05711960.4 mailed Jun. 3, 2009. cited by other .
Marmorstein et al., "Bestrophin, the product of the Best vitelliform macular dystrophy gene (VMD2), localizes to the basolateral plasma membrane of the retinal pigment epithelium," Proc Natl Acad Sci U S A, Nov. 7, 2000;97(23):12758-63. cited by other .
Fuhrmann et al., "Extraocular mesenchyme patterns the optic vesicle during early eye development in the embryonic chick" Development, Nov. 2000;127(21):4599-609. cited by other .
Zaghloul et.al., "Step-wise specification of retinal stem cells during normal embryogenesis," Biol Cell, May 2005;97(5):321-37. cited by other .
Dunn et al., "ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with

differentiated properties," Exp Eye Res., Feb. 1996;62(2):155-69. cited by other .
Davis et al., "A human retinal pigment epithelial cell line that retains epithelial characteristics after prolonged culture," Invest Ophthalmol Vis Sci., Apr. 1995;36(5):955-64. cited by other .
Hu and Bok, "A cell culture medium that supports the differentiation of human retinal pigment epithelium into functionally polarized monolayers," Mol Vis., Feb. 7, 2001;7:14-9. cited by other .
Zhang et al., "In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells," Nat Biotechnol., Dec. 2001;19(12):1129-33. cited by other .
Amit et al., "Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture," Dev Biol., Nov. 15, 2000;227(2):271-8. cited by other .
Thomson et al., "Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts," Science, Nov. 6, 1998;282(5391):1145-7. Erratum in: Science Dec. 4, 1998;282(5395):1827. cited by other .
Schuldiner et al., "Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells," Proc Natl Acad Sci U S A, Oct. 10, 2000;97(21):11307-12. cited by other .
Kehat et al., "Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes," J Clin Invest., Aug. 2001;108(3):407-14. cited by other .
Carpenter et al., "Enrichment of neurons and neural precursors from human embryonic stem cells," Exp Neurol., Dec. 2001;172(2):383-97. cited by other .
Binder et al., "Transplantation of autologous retinal pigment epithelium in eyes with foveal neovascularization resulting from age-related macular degeneration: a pilot study." Am. J. Ophthalmol. Feb. 2002;133(2):215-25. cited by other .
http://www.answers.com/topic/embryonic-stem-cell-1, 2008. cited by other .
Klimanskaya et al., "Derivation and Comparative Assessment of Retinal Pigment Epithelium from human Embryonic Stem Cells Using Transcriptomics" Cloning and Stem Cells, 6: 217-245, 2004. cited by other .
Lund et al., "Human Embryonic Stem Cell-Derived Cells Rescue Visual

Function in Dystrophic RCS Rats," Cloning and Stem Cells, 8:3:189-199, 2006. cited by other .
Opas et al., "Formation of retinal pigment epithelium in vitro by transdifferentiation of neural retina cells," Int.J.Dev. Biol., 45: 633-642 (2001). cited by other .
Sauve et al., "Preservation of visual responsiveness in the superior colliculus of RCS rats after retinal pigment epithelium cell transplantation," Neuroscience. 2002;114(2):389-401. cited by other .
Schraermeyer et al., "Subretinally transplanted embryonic stem cell rescue photoreceptor cells from degeneration in the RCS rats," Cell Transplantation, 10:673-680. (2001). cited by other .
Van Meurs et al., Br J Ophthalmol. Jan. 2004;88(1):110-3. Autologous peripheral retinal pigment epithelium translocation in patients with subfoveal neovascular membranes. cited by other .
Gouras et al., Invest Ophthalmol Vis Sci. Oct. 2002;43(10):3307-11. Retinal degeneration and RPE transplantation in Rpe65(-/-) mice. cited by other.

４－７　考察

ＡＣＴ社の同一由来の特許出願（ＰＣＴ／ＵＳ２００５／００２２７３、ＷＯ２００５／０７００１１）が米国では特許登録（ＵＳ７７３６８９６）され、一方、日本では拒絶査定（特願２００５－５５１３９２）されている。また、日米ともに、ほぼ同じ引用文献等を参酌し、かつ、その主要な引用文献は、霊長類ＥＳ細胞からの網膜色素上皮（ＲＰＥ）細胞の分化誘導法に関するＫａｗａｓａｋｉらの文献（２００２年）とヒトＥＳ細胞からの分化誘導に関するＴｈｏｍｓｏｎらの文献（１９９８年）であったのにも拘わらず、ヒトＥＳ細胞からのＲＰＥ細胞を分化誘導法に係る本願発明は、その進歩性及び進歩性（非自明性）において、日米で全く相反する判断がなされている。

この判断の差異が本願発明の特許性の有無の左右したことは、上記５及び６における審査経過の記録から明らかである。この点を中心に以下、考察していく。

（１）日米の最初の拒絶理由（Non　Final　Rejection）

日米の審査官とも、ともにKawasaki らの霊長類ＥＳ細胞からのＲＰＥ細胞への分化誘導法に関する引用文献をベースに、米国ではこれに Thomson らの文献と組み合わせて参酌すると、Kawasaki らの用いた霊長類がＥＳ細胞がヒトＥＳ細胞でなくても、本願発明は当業者にとって自明である（米国特許法第１０３

条違反）とし拒絶理由通知を行っている。
　一方、日本では、Kawasaki らの引用文献と高橋政代らの引用文献（総説、２００３年）を参酌して、新規性（日本特許法第２９条第１項第３号）及び進歩性（日本特許法第２９条第２項）違反として拒絶理由通知を行った。
　この時点では、日米ともに同一の極めて妥当な実務判断であった。
　このことは、ウイシコンシン大学のＴＬＯであるWisconsin　Alumni Reseach　Foundation（WARF）が所有するヒト胚由来のヒトＥＳ細胞に関する特許（US7029913）は再審査で当該ヒトＥＳ細胞の発明はマウスＥＳ細胞を作るための方法を示した先行文献から自明と判断され、当該特許は無効だと結論された事例（2010年4月２８日付け）から鑑みて、隅蔵康一・竹田英樹監修「幹細胞の特許戦略」pp151,発明協会、２０１１年発行)、かつ、マウスようなげっ歯類でなく、ヒトと近縁奈霊長類ＥＳ細胞から網膜色素上皮細胞への分化誘導に関する先行文献の存在は新規性・進歩性の面において、極めて有力な先行技術である。この点からも拒絶理由は極めて妥当なものである。

（２）日米におけるその後の判断の分かれ目
（ｉ）米国においては、ＡＴＣ社の出願人（弁理士）はKawasaki らのカニクイザルＥＳ細胞から分化誘導させて取得した網膜色素上皮（ＲＰＥ）細胞は Pax６マーカーが陽性で、本願発明のヒトＥＳ細胞から分離誘導された Pax 陰性のＲＰＥ細胞とは異なるものであること、フィーダー細胞の非存在かで自発的に分化させる方法で作製したもので、Kawasaki らと Thomson らの先行文献からは当業者が容易に創作できるものではないことを主張して審査官を納得させた。
　その結果、Final　Rejection のオフィスアクションで、米国特許法第１０３条違反の拒絶理由を正式に撤回した。それ以降の審査においては、専ら、開示要件、実施要件違反（米特許法第１１２条）のみについて審査し、出願人の数次の補正で特許査定した。
（ⅱ）日本においては、ATC 社の出願人（弁理士）は意見書で上記（ｉ）と同様な反論･主張を行ったが、網膜再生医療分野の専門家である刊行物等の情報提供者からKawasaki らのＲＰＥ細胞にはPax 陽性の未成熟ＲＰＥ細胞と Pax 陰性のＲＰＥ細胞が混在することに関する写真資料の提供、及び網膜再生医療分野の技術常識（未成熟ＲＰＥ細胞はＰａｘ陽性であるが培養を継続すると成熟ＲＰＥ細胞は Pax 陰性になること。）の情報の提供、フィーダー細胞の存在の有無はＲＰＥ細胞への分化に影響を与えないという技術情報、並びに本願の発明者であるIrina　Klimanskaya がNature　Review 誌でKawasaki らの霊長類ＥＳ細胞からの分化誘導したＲＰＥ細胞を評価していること等の情報提供と相俟って、審査官はＲＰＥ細胞としては同じものであること等、本願発明には新規性・進

歩性は認められないとの適正な判断を行った。

（３）まとめ

再生医療分野のような先端バイオ分野では、生物資源の由来の相違、プロセスの微妙な差異の効果　産生物の同一性の証明等、特許性の判断には深い知識・経験が要る。本事例では、本願の発明者であるIrina　Klimanskaya氏は網膜再生医療分野では著名な研究者である。かかる科学者が出願する発明の特許性（信憑性）は一般に高く評価される傾向にあり、またその意見・主張は通りやすいもの考えられる。

幸い、日本にはこの分野の世界最先端の研究陣がいたので、このような適正な対応できたものと推察される。

最先般の科学技術分野での特許業務には、弁理士等の知的財産の関係者と研究者らとの深い協働作業が必要であることの証左として本事例は参考になるものと思う。

また、基礎研究段階の研究成果については研究者のみの立場、判断のみでなく、その組織の知的財産成果としての評価判断が共になされることが重要である。本調査事例においても、研究成果を論文公表と歩調合せて、その組織の特許出願等の知的財産評価機能が適切に発揮されていたならば、かかる米国特許の登録発生は未然に防げたものと考えられる。その意味では、将来の産業利用の可能性を秘めた基礎研究成果の知的財産的目利きの育成・重視とその者が容易に関与できる組織環境の整備・充実が重要であることを示唆している。

５．総論

このように、現在は日本の研究が先行しているが、米国では、再生医療に注目が集まり、iPS細胞を利用した再生医療にこれから生じるであろう莫大な利益を求めて、日本とは比較にならない莫大な研究費が投じられつつある。今回のノーベル賞を受賞した山中教授も、未だマラソンの折り返しであり、これからの競争が重要である。が、日本は交代のランナーもなく、エイドのドリンクも水だけ、一方、米国は交代のランナーも多く、ドリンクもスペシャルドリンクであり、これからの戦いは先頭を走れるか疑問であるとも言っている。以前、バイエル社の桜田特許を取り上げ、検討したが、この特許は、米国ベンチャーのiZUMI社に移り、更には同様米国西海岸のベンチャーiPIERIAN社に移るも、リーマンショックの資金欠乏からか、iPIERIAN社はiPS細胞研究から撤退し、幸いにこれらの特許を京都大学に譲ることとなった。今回は、これら米国ベンチャーが保有する特許は支障となるのを免れたが、前述の網膜再生にかかわる

高橋特許は、同様な特許が米国で成立してしまった。一つには、当初、高橋氏と設立したベンチャーから幹細胞を使った網膜再生の方法について出願されたものの、審査請求されることなく、みなし取り下げとなってしまい、改良方法で出願するも、米国社の出願よりも後願となってしまったことがある。現時点でわかる特許特許は１年半前のものである。恐らく、現時点では、どんどんと出願されていると思われ、今後も有利性を保つためには、効率の良い研究投資と、弁理士もチームに入った効率の良い出願、世界的な特許化が求められる。